

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Atividades Biológicas de Várias Espécies de *Plectranthus* e
Influência sobre a Estrutura de Proteínas**

Elsa Sofia Coelho Brito

Mestrado em Química
Química, Saúde e Nutrição

Dissertação orientada por:
Maria Luísa Mourato de Oliveira Marques Serralheiro

Agradecimentos

A realização deste trabalho prático e desta dissertação não seriam possíveis sem o contributo de várias pessoas que ao longo deste tempo foram incansáveis, quer fosse na ajuda no trabalho de laboratório, quer fosse na orientação ou nos momentos de lazer. A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização com sucesso desde mestrado, um enorme obrigada do fundo do coração!!

Em primeiro lugar queria agradecer imenso a preciosa ajuda dos meus pais, todo o apoio e força que me deram, a educação que me proporcionaram e que me permitiu estar aqui hoje, todo o amor, amizade e paciência sem o qual seria impossível chegar onde cheguei. À minha irmã que mesmo com as discussões e confusões típicas de irmãs, sempre me apoiou e me acompanhou nesta fase com boa disposição. A toda a minha família um grande obrigada!

À minha orientadora Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, por me ter aceite primeiro como voluntária no laboratório, por me ter aconselhado a seguir este mestrado, por me ter orientado ao longo desta dissertação, por todas as experiências de vida que esta dissertação me proporcionou e finalmente pela amizade e carinho que sempre demonstrou. Obrigada por toda a paciência e por toda a disponibilidade que sempre teve!

Aos meus colegas de laboratório, Joana Henriques, Luis Gomes, Laura Guedes, Ana Assunção que foram sempre uma ótima companhia ao longo deste ano, por me ajudarem sempre que necessário e pela boa disposição constante que animaram, sem sombra de dúvidas, o laboratório. Pelos momentos de convívio que tivemos todos juntos que vou guardar na minha memória com muito carinho. Fomos uma equipa espetacular de trabalho e acreditem que foram sem dúvida uma ajuda preciosíssima ao longo de todo o ano.

Um agradecimento especial à Joana Peres por todas as vivências que tivemos, por todos os bons momentos que vivemos, pelo teu carinho e pela tua grande amizade, pelos teus conselhos por toda a tua ajuda no trabalho que resultou nesta dissertação, pelos momentos que vivemos fora do laboratório, por acreditares em mim e por insistires para que continue mesmo quando parece não existir forças para tal. Um enorme obrigada!!

Ao André Silva, por teres sido um pilar e por me ajudares a manter focada na conclusão dos meus objetivos, por me ajudares nos momentos de crise e desespero, pela companhia no laboratório nos fins-de-semana que passei a trabalhar, pelos *brainstorming* que sempre te

disponibilizaste a realizar comigo. Pela companhia em Cambridge, sem ti teria sido bem mais complicado a ida ao congresso e todo o tempo que lá estive, e claro pela tua amizade e paciência. Um enorme obrigada!

Ao Doutor Pedro Falé por todo o ensinamento que me transmitiu e por me ter ajudado a iniciar este caminho no mundo da investigação, pela preocupação que sempre demonstrou e por todas as dúvidas que esclareceu. E à Doutora Rita Pacheco por estar sempre disponível para me ajudar e pela ajuda que sempre deu em tudo o que precisei. Um muito obrigada aos dois, quero agradecer também pela amizade e paciência que tiveram ao longo de todo este tempo.

À Inês Silva e à Telma Reis por todo o carinho, amizade, conversas e boa disposição no laboratório. A todos os meus amigos que me acompanharam ao longo da licenciatura e deste mestrado, à Marisa Magalhães e André Freire por todos os dias de alegria desde que entrei na licenciatura, pela amizade, pela boa disposição e por todos os momentos que vivemos!

Queria também agradecer à Professora Lia Ascensão por ter fornecido o material vegetal com o qual trabalhei.

A todos os referidos e aqueles que ficaram por referir e que ajudaram direta e indiretamente para a conclusão desta dissertação, estou eternamente agradecida!!!

Um muito obrigada!!!

Resumo

As propriedades fitoquímicas de plantas têm sido alvo de muitos estudos químicos e bioquímicos no intuito de arranjar novos fármacos e soluções para resolver lacunas que os fármacos existentes no mercado não conseguem. Para melhor entender o gênero *Plectranthus* a nível de composição e de atividades biológicas, selecionaram-se dez plantas: *P. barbatus* Andr, *P. ernstii* Codd, *P. gradidentatus* Gürke, *P. lanuginosus* (Benth) Agnew, *P. madagascariensis* (Pers.) Benth var “Lynne”, *P. neochilus* Schltr, *P. venter* Van Jaarsv, *P. verticillatus* (L.f.) Druce var. “Barborton”, *P. verticillatus* (L.f.) Druce var “Ubombo” e *P. zuluensis* T. Cooke.

Ao longo do trabalho prático realizado para esta dissertação foram analisados os extratos aquosos ao nível da sua constituição (componente maioritário, quantificação de fenóis e taninos totais). Para além da caracterização fitoquímica, foram também analisadas as capacidades antioxidantes dos extratos, as capacidades inibitórias dos enzimas acetilcolinesterase e álcool desidrogenase, a citotoxicidade e a simulação do metabolismo destas decocções, bem como a interação da proteína com os compostos fenólicos a nível da atividade biológica. Estudou-se também o efeito da temperatura na estrutura da proteína.

Na caracterização fitoquímica dos extratos identificou-se o componente maioritário como sendo o ácido rosmarínico, existindo em diferentes concentrações nos vários extratos. Percebeu-se também que o extrato do *P. lanuginosus* e do *P. zuluensis* são os mais ricos em fenóis e taninos totais ao contrário do *P. venter* que é o mais pobre nestes compostos. Estas características fitoquímicas determinam as atividades biológicas que cada extrato tem. Relativamente às capacidades antioxidantes de cada extrato, o que possui maior capacidade antioxidante é o extrato de *P. zuluensis* ($13,31 \pm 1,43 \mu\text{g/mL}$) sendo o que possui menor capacidade o *P. venter* ($131,05 \pm 13,41 \mu\text{g/mL}$). Já na capacidade de inibição do enzima acetilcolinesterase o extrato que mostrou maiores capacidades inibitórias foi o extrato de *P. zuluensis* ($0,08 \pm 0,05 \text{ mg/mL}$) sendo o que possui menor capacidade o *P. venter* ($1,03 \pm 0,19 \text{ mg/mL}$). Para o enzima álcool desidrogenase o extrato mais ativo foi *P. verticillatus* var. “Ubombo” ($25 \pm 6 \mu\text{g/mL}$) e o menos ativo foi o *P. venter* ($104 \pm 33 \mu\text{g/mL}$). Nenhum dos extratos mostrou alterações após sofrer a simulação do metabolismo gástrico e pancreático, nem mostrou possuir citotoxicidade. O *P. zuluensis* por possuir uma elevada atividade na maioria dos testes realizados, foi submetido ao isolamento de três frações, que o constituíam, a capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase foi testada para determinar em que fração se encontrava o composto mais ativo.

A estrutura de proteínas sobre a influência da decocção de *P. barbatus*. e *P. zuluensis* foram também estudadas, sendo que se variou a concentração de decocção presente em solução e a temperatura em que a mistura foi submetida. Com este estudo percebeu-se que consoante o aumento de temperatura e de concentração da decocção, maiores eram as alterações conformacionais que a proteína sofria e que a atividade biológica como a inibição enzimática, como por exemplo a atividade acetilcolinesterase aumentava na presença de proteína.

Palavras-chave: *Plectranthus*, ácido rosmarínico, proteína, atividades biológicas

Abstract

The phytochemical proprieties have been object of chemicals and biochemical studies to find news drugs or new solutions to use when the existing drugs can't be used. To better understand the *Plectranthus* genus composition or biological activities, ten plants have been selected: *P. barbatus* Andr, *P. ernstii* Cood, *P. gradidentatus* Gürke, *P. lanuginosus* (Benth) Agnew, *P. madagascariensis* (Pers.) Benth var "Lynne", *P. neochilus* Schltr, *P. venteri*, *P. verticillatus* (L.f.) Druce var. "Barberton", *P. verticillatus* (L.f.) Druce var. "Ubombo" e *P. zuluensis* T. Cooke.

In the practical work done for this dissertation, the constitution of plants' aqueous extracts was analysed (major component, total phenols and tannins quantification). Beside the phytochemical characterization, the antioxidant capacity of extract and the inhibitory capacity of acetylcholinesterase and alcohol dehydrogenase, the cytotoxicity were analysed. The simulation studies of gastric and pancreatic metabolism of infusions were performed.

In the extract phytochemical characterization, the major component identify was rosmarinic acid and each extract has a different concentration. *P. lanuginosus* and *P. zuluensis* are the extracts that have the higher concentration in phenols and tannins totals, in contrary the *P. venteri* have the lowest concentration of these two type of components. These phytochemical characteristics have influence on the biological activities of each extract. In relation to the antioxidant capacity, the extract that has the higher capacity is the *P. zuluensis* (13.31 ± 1.43 µg/mL) and the extract that have lower antioxidant capacity is the *P. venteri* (131.05 ± 13.41 µg/mL). In the activity anti-acetylcholinesterase, the extract that shows the higher inhibitory capacity was *P. zuluensis* (0.08 ± 0.05 mg/mL) and the extract that has the lower inhibitory capacity was *P. venteri* (1.03 ± 0.19 mg/mL). For the inhibition of alcohol dehydrogenase, the extract with more activity was *P. verticillatus* (L.f.) Druce var "Ubombo" (25 ± 6 µg/mL) unlike *P. venteri* (104 ± 33 µg/mL), that showed the least activity. Any extract shows alterations in the chromatographic profile after the gastric and pancreatic metabolism simulation, and any extracts have cytotoxicity profile.

The *P. zuluensis* showed a high activity on the most tests performed, because of this, three fractions were collected according to the chromatographic profile of the extract, and the activity anti-acetylcholinesterase of these fractions were analysed.

The influence of *P. barbatus* and *P. zuluensis* infusion on the protein structure was studied, the protein was submitted to different concentrations of infusion at different temperatures. In this

study it was possible to understand that higher temperatures and infusion concentration caused higher conformational changes in the protein. The effect of the protein in the polyphenols biological activities were also evaluated.

Keywords: *Plectranthus*, rosmarinic acid, protein, biological activities

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema da molécula de ácido rosmarínico.....	8
Figura 2. Estrutura básica de flavonóides. ²¹	9
Figura 3. Molécula de ácido gálico e exemplo de um galotanino. [adaptado de Peñarrieta <i>et al.</i> em 2014] ²⁴	10
Figura 4. Molécula de ácido hidroxidifénico e elágico, e exemplo de um elagitanino. [adaptado de Peñarrieta <i>et al.</i> em 2014] ²⁴	11
Figura 5. Esquema abreviado da via metabólica do etanol. [adaptado de Dorokhov <i>et al.</i> (2015)] ⁴⁰	14
Figura 6. Esquema reacional da reação do enzima acetilcolinesterase. [adaptado de Frasco <i>et al.</i> (2005)] ⁷⁴	32
Figura 7. Esquema reacional da reação que ocorre no ensaio do DPPH'. [adaptado de Teixeira <i>et al.</i> (2013)] ⁷⁶	34
Figura 8. Esquema da reação que ocorre no ensaio do MTT. [adaptado de Ebada <i>et al.</i> (2008)] ⁷⁸	36
Figura 9. Cromatogramas dos extratos das diferentes espécies de <i>Plectranthus</i> usando a concentração de 1 mg/mL.	40
Figura 10. Espetro do ácido rosmarínico na decocção do <i>P. barbatus</i> (Tr=14,11 minutos).	41
Figura 11. Gráfico da correlação entre a quantificação de taninos totais em função da concentração de ácido rosmarínico para os diferentes extratos.....	44
Figura 12. Gráfico da correlação entre a quantificação de fenóis totais em função da concentração de ácido rosmarínico para os diferentes extratos.....	45
Figura 13. Gráfico com a quantificação de ácido rosmarínico, taninos e fenóis totais nos diferentes extratos.	45
Figura 14. Gráfico da correlação entre os valores de EC ₅₀ e a concentração de ácido rosmarínico existente entre cada extrato.	47
Figura 15. Gráfico da correlação entre os valores de EC ₅₀ e a concentração de taninos totais existente entre cada extrato.	48
Figura 16. Gráfico da correlação entre os valores de EC ₅₀ e a concentração de fenóis totais existente entre cada extrato.	48
Figura 17. Gráfico de correlação da concentração de ácido rosmarínico com os valores de IC ₅₀ para o ensaio cinético de acetilcolinesterase.	51
Figura 18. Gráfico da correlação do IC ₅₀ para AChE com concentração de taninos totais.....	51

Figura 19. Gráfico da correlação do IC ₅₀ para AChE com concentração de fenóis totais.	52
Figura 20. Gráfico de correlação entre IC ₅₀ para o álcool desidrogenase e a concentração de ácido rosmarínico.	54
Figura 21. Gráfico de correlação entre IC ₅₀ para o álcool desidrogenase e a concentração de taninos totais.....	55
Figura 22. Gráfico de correlação entre IC ₅₀ para o álcool desidrogenase e a concentração de fenóis totais.....	55
Figura 23. Cromatograma do extrato <i>P. zuluensis</i> com o método descrito em “Isolamento de frações da amostra de <i>P. zuluensis</i> ” com o eluente metanol: ácido fórmico.....	59
Figura 24. Cromatograma do extrato <i>P. zuluensis</i> com o método descrito em “Análise cromatográfica das decocções das diferentes espécies de <i>Plectranthus</i> ”, com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	59
Figura 25. Cromatograma da fração 1F-R-F recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido fórmico.	60
Figura 26. Cromatograma da fração 2F-R-F recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido fórmico.	60
Figura 27. Cromatograma da fração 3F-R-F recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido fórmico.	61
Figura 28. Cromatograma da fração 1F-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	62
Figura 29. Cromatograma da fração 2F-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	62
Figura 30. Cromatograma da fração 3F-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	62
Figura 31. Cromatograma da fração 1A-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	63

Figura 32. Cromatograma da fração 2A-R-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	64
Figura 33. Cromatograma da fração 3A-R-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	64
Figura 34. Cromatograma da fração 1A-L-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no liofilizador e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.	65
Figura 35. Cromatograma da fração 2A-L-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no liofilizador e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.	65
Figura 36. Cromatograma da fração 3A-E-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada na linha de N ₂ e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	66
Figura 37. Cromatograma da fração 1A-N-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, não sofrendo qualquer tipo de evaporação e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	66
Figura 38. Cromatograma da fração 2A-N-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, não sofrendo qualquer tipo de evaporação e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	67
Figura 39. Cromatograma da fração 3A-N-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, não sofrendo qualquer tipo de evaporação e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.....	67
Figura 40. Estrutura do medioresinol.....	69
Figura 41. Gráfico com os resultados da citotoxicidade nas linhas celulares MCF-7 e HepG-2.	70
Figura 42. Gráfico de FT-IR das amostras BSA (linha azul), BSA + P. barbatus 0,4 mg/mL (linha laranja), BSA + P. barbatus 2 mg/mL (linha cinzenta), BSA + P. barbatus 4 mg/mL (linha amarela) a diferentes temperaturas.	73
Figura 43. Rácios das estruturas β/α para amostra de BSA com as diferentes concentrações de P. barbatus.	74
Figura 44. Gráfico de FT-IR das amostras BSA (linha azul), BSA + P. zuluensis 0,4 mg/mL (linha laranja), BSA + P. zuluensis 2 mg/mL (linha cinzenta), BSA + P. zuluensis 4 mg/mL (linha amarela) a diferentes temperaturas.	76
Figura 45. Rácios das estruturas β/α para amostra de BSA com as diferentes concentrações de P. zuluensis.....	77

Figura 46. Gráfico de percentagem de atividade do enzima AChE na presença das diferentes amostras de BSA com a decocção de <i>P. barbatus</i> testadas no FT-IR.....	79
Figura 47. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 2 mg/mL de <i>P. barbatus</i> para as diferentes temperaturas.	80
Figura 48. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 4 mg/mL de <i>P. barbatus</i> para as diferentes temperaturas.	81
Figura 49. Gráfico de percentagem de atividade do enzima AChE na presença das diferentes amostras de BSA com a decocção de <i>P. zuluensis</i> testadas no FT-IR.	82
Figura 50. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 2 mg/mL de <i>P. zuluensis</i> para as diferentes temperaturas.	83
Figura 51. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 4 mg/mL de <i>P. zuluensis</i> para as diferentes temperaturas.	83
Figura 52. Gráfico de percentagem de atividade antioxidante das diferentes amostras testadas no FT-IR para a decocção do <i>P. barbatus</i>	84
Figura 53. Gráfico de percentagem de atividade antioxidante das diferentes amostras testadas no FT-IR para a decocção do <i>P. zuluensis</i>	85
Figura 54. Imagens das eletroforeses nativas das diferentes amostras referentes ao <i>P. barbatus</i> , sendo 1, 5, 9, 13, 17 e 21 a BSA às respetivas temperaturas; 2, 6, 10, 14, 18 e 22 a BSA conjuntamente com 0,4 mg/mL de <i>P. barbatus</i> ; 3, 7, 11, 15, 19 e 23 a BSA conjuntamente com 2 mg/mL de <i>P. barbatus</i> ; 4,8,12,16,20 e 24 a BSA conjuntamente com 4 mg/mL de <i>P. barbatus</i>	87
Figura 55. Imagens das eletroforeses nativas das diferentes amostras referentes ao <i>P. zuluensis</i> , sendo 1, 5, 9, 13 e 17 a BSA às respetivas temperaturas; 2, 6, 10, 14 e 18 a BSA conjuntamente com 0,4 mg/mL de <i>P. zuluensis</i> ; 3, 7, 11, 15 e 19 a BSA conjuntamente com 2 mg/mL de <i>P. zuluensis</i> ; 4, 8, 12, 16 e 20 a BSA conjuntamente com 4 mg/mL de <i>P. zuluensis</i>	88

Índice de Tabelas

Tabela 1. Tabela de reagentes.	22
Tabela 2. Gradiente do método de HPLC para a identificação dos compostos.....	26
Tabela 3. Gradiente de HPLC usado para o isolamento de frações da amostra de <i>P. zuluensis</i> .27	
Tabela 4. Tabela com motivos estruturais e respectivos números de onda na espectroscopia de FT-IR. ⁶⁹	28
Tabela 5. Tabela de massas de planta, massa de extrato obtido e respectivos rendimentos.	39
Tabela 6. Tabela com os resultados da quantificação de ácido rosmarínico, taninos e fenóis totais nas diferentes amostras, para cada quantificação encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não são significativamente diferentes.	43
Tabela 7. Valores de EC ₅₀ para o ensaio do DPPH', na tabela encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não apresentam significância estatística.	46
Tabela 8. Tabela com os valores de IC ₅₀ para cada extrato, na tabela encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não apresentam significância estatística.	49
Tabela 9. Tabela de valores de IC ₅₀ para o enzima álcool desidrogenase, na tabela encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não apresentam significância estatística.....	53
Tabela 10. Tabela com os resultados das digestões gástrica e pancreática.....	57
Tabela 11. Tabela com a nomenclatura das frações.....	58
Tabela 12. Tabela com massas obtidas para as frações recolhidas.....	58
Tabela 13. Valores de IC ₅₀ para o ensaio da acetilcolinesterase para as frações 1F-R e 3F-R. ...	68
Tabela 14. Tabela com a percentagem de inibição utilizando <i>P. zuluensis</i> (0,07 mg/mL) e a fração 1A-L (0,1 mg/mL).....	69
Tabela 15. Tabela com os valores de IC ₅₀ para cada linha celular e a respetiva análise estatística, amostras identificadas com letras iguais não são diferentes estatisticamente.	71
Tabela 16. Análise estatística dos resultados obtidos para a percentagem de atividade do enzima AChE na presença das diferentes amostras de BSA com a decocção de <i>P. barbatus</i> , sendo *- P<0,05, **-P<0,01 e ***-P<0,001.	80
Tabela 17. Análise estatística dos resultados obtidos para a percentagem de atividade do enzima AChE na presença de BSA e diferentes concentrações de <i>P. zuluensis</i> , sendo *- P<0,05, **-P<0,01 e ***-P<0,001.....	82
Tabela 18. Análise estatística dos resultados obtidos para o valor de EC ₅₀ para o ensaio do DPPH' das amostras de BSA com a decocção de <i>P. barbatus</i> , sendo *- P<0,05, **-P<0,01 e ***-P<0,001.	85

Tabela 19. Análise estatística dos resultados obtidos para o valor de EC_{50} para o ensaio do DPPH' para as amostras de BSA com diferentes concentrações de <i>P. zuluensis</i> , sendo *- $P<0,05$, **- $P<0,01$ e ***- $P<0,001$	86
Tabela 20. Tabela com os resultados da quantificação de proteínas para as amostras com a decocção <i>P. barbatus</i> e as respectivas retas de calibração, sendo y o valor de absorvência e x a concentração.....	90
Tabela 21. Tabela com os resultados da quantificação de proteínas para as amostras com a decocção <i>P. zuluensis</i> e as respectivas retas de calibração, sendo y o valor de absorvência e x a concentração.....	91

Abreviaturas e Siglas

AChE – acetilcolinesterase

AChI – iodeto de acetilcolina

ADH – álcool desidrogenase

ALDH – aldeído desidrogenase

APS – persulfato de amônio (do inglês *ammonium persulfate*)

AR – ácido rosmarínico (do inglês *rosmarinic acid*)

BHT – hidroxitolueno butilado (do inglês *butylated hydroxitoluen*)

BSA – albumina de soro bovino (do inglês *bovin serum albumin*)

BuChE – butirilcolinesterase

CaF₂ – Floureto de cálcio

CD – dicromismo circular (do inglês *circular dichroism*)

CO₂ – dióxido de carbono

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)

DTT – 1,4-ditioreitol

EC₅₀ – concentração eficiente (*efficient coefficient*) de extinção do radical correspondente a 50 %

EDTA – ácido etilenodiamiotetraacético

EGCG – galato de epigalocatequina

FBS – soro bovino fetal (do inglês *fetal bovin serum*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FeCl₃ – Cloreto de ferro

FT-IR – espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier

HCl – ácido clorídrico

HepG2 – células de carcinoma hepatocelular

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HSA – albumina do soro humano (do inglês *human serum albumin*)

IC₅₀ – concentração inibitória (*inhibitory concentration*) correspondente a 50 %

LC-MS – *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

MCF-7 – células de adenocarcinoma mamário

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólico

NaCl – cloreto de sódio

NAD⁺ – dinucleótido de adenina β-nicotinamida no estado oxidado

NADH – dinucleótido de adenina β-nicotinamida no estado reduzido

NADP⁺ – fosfato de dinucleótido de adenina β-nicotinamida no estado oxidado

NADPH – fosfato de dinucleótido de adenina β-nicotinamida no estado reduzido

PAGE – eletroforese de gel de poliacrilamida (do inglês *polyacrilamide gel electrophoresis*)

PBS – tampão de sais de fosfato (do inglês *phosphate-buffered saline*)

Pen-Strep – penicilina-streptavidina

SDS – éster bis(2-etilhexil) de ácido sulfosuccínico

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

Tris – tris(hidroximetil)-aminometano

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Utilização de plantas para fins medicinais.....	2
1.2.	Problemática.....	3
2.	Objetivos	4
3.	Revisão bibliográfica	6
3.1.	Espécies de <i>Plectranthus</i> : etnobotânica, composição química e atividades biológicas	7
3.1.1.	O género <i>Plectranthus</i> e o ácido rosmarínico	7
3.1.1.1.	Constituintes das decocções – Compostos fenólicos (flavonóides, taninos, fenóis)	8
3.1.2.	Atividades biológicas.....	11
3.1.2.1.	Inibição do enzima acetilcolinesterase	11
3.1.2.2.	Álcool desidrogenase e o metabolismo do álcool.....	13
3.1.2.3.	Capacidade antioxidante.....	15
3.2.	Influência de decocções de <i>P. barbatus</i> e <i>P. zuluensis</i> na estrutura de proteínas....	17
3.2.1.	Influência de compostos fenólicos e da temperatura em proteínas	17
4.	Procedimento Experimental	20
4.1.	Materiais.....	21
4.1.1.	Material vegetal	21
4.1.2.	Linhas celulares	21
4.1.3.	Reagentes.....	21
4.2.	Métodos.....	23
4.2.1.	Preparação de extratos	23
4.2.2.	Quantificação de taninos	24
4.2.3.	Quantificação de fenóis totais.....	24

4.2.4.	Análise cromatográfica por HPLC- RP-DAD	25
4.2.4.1.	Análise cromatográfica das decocções das diferentes espécies de <i>Plectranthus</i>	25
4.2.4.2.	Isolamento de frações da amostra de <i>P. zuluensis</i>	26
4.2.5.	Análise da estrutura de proteínas por FT-IR	28
4.2.6.	Análise da estrutura de proteínas por eletroforese nativa.....	29
4.2.6.1.	Quantificação de proteínas	30
4.2.7.	Simulação do metabolismo das decocções <i>in vitro</i> por ação de suco gástrico e suco pancreático.....	31
4.2.8.	Ensaio cinético de acetilcolinesterase.....	32
4.2.9.	Ensaio cinético de álcool desidrogenase.....	33
4.2.10.	Capacidade antioxidante.....	34
4.2.11.	Crescimento celular e manutenção das linhas celulares	35
4.2.12.	Citotoxicidade em diferentes linhas celulares	35
4.2.13.	Atividades biológicas das frações do <i>P. zuluensis</i>	37
4.2.14.	Ação de decocções sobre a estrutura da BSA e suas atividades biológicas.....	37
4.2.15.	Análise estatística.....	37
5.	Resultados e Discussão	38
5.1.	Caracterização das diferentes espécies de <i>Plectranthus</i> e estudo das suas atividades biológicas.....	39
5.1.1.	Determinação da composição das decocções e concentração de ácido rosmarínico.....	39
5.1.2.	Composição dos extratos em taninos e fenóis totais	42
5.1.3.	Atividade antioxidante	46
5.1.4.	Ensaio cinético de inibição do enzima acetilcolinesterase	49
5.1.5.	Ensaio cinético de álcool desidrogenase.....	53
5.1.6.	Simulação do metabolismo das decocções <i>in vitro</i> por ação de suco gástrico e suco pancreático.....	56

5.1.7.	Isolamento de frações da amostra de <i>P. zuluensis</i> e suas atividades biológicas	57
5.1.7.1.	Ensaio cinético de acetilcolinesterase das frações <i>P. zuluensis</i>	68
5.1.8.	Citotoxicidade em diferentes linhas celulares	70
5.2.	Influência de decocções de <i>P. barbatus</i> e <i>P. zuluensis</i> na estrutura de proteínas....	72
5.2.1.	Análise da estrutura de proteínas por FT-IR	72
5.2.1.1.	Atividades biológicas	78
5.2.1.1.1.	Ensaio cinético da acetilcolinesterase	78
5.2.1.1.2.	Atividade antioxidante.....	83
5.2.2.	Eletroforese nativa	86
5.2.2.1.	Quantificação de proteínas	89
6.	Conclusões e Perspetivas Futuras	93
7.	Referências Bibliográficas	96

1. Introdução

1.1. Utilização de plantas para fins medicinais

Desde a antiguidade que o ser humano recorre à natureza para seu benefício, seja no que toca a alimentação ou no que toca a fins medicinais. As civilizações mais antigas como o Egito já recorriam a plantas para tratamentos e terapêuticas, e esse costume não se perdeu até aos dias de hoje, sendo que muitas outras civilizações utilizaram as plantas como recurso em caso de doença como por exemplo da cultura chinesa e greco-árabe.¹⁻³

Segundo Petrovskaja, há mais de 5000 anos que existem provas escritas do uso de plantas medicinais para produção de fármacos, foram encontradas em Nagpur placas de barro que possuíam 12 receitas de preparação de fármacos onde estavam incluídas 250 plantas.⁴ Desde essa altura que os registos do uso de plantas para fins medicinais foram aumentando, surgindo registos muito relevantes como é o caso do livro chinês “Pen T’Sao” escrito por Shen Nung, o papiro de Ebers, os estudos de Hipócrates e o livro “De Materia Medica” escrito por Dioscórides, o pai da farmacognózia.^{4, 5}

A maioria das pessoas utiliza plantas medicinais para o tratamento de patologias, mas muitas vezes não entendem a razão científica para tal nem entendem o porquê do efeito gerado por estas plantas. Contudo sabem por experiência e por conselhos de antepassados seus, que as plantas medicinais podem ser bastante eficientes em alguns tratamentos.¹

Com o avanço da medicina e da indústria farmacêutica, o recurso a plantas medicinais para tratar patologias diminuiu, contudo ainda hoje continua a ser utilizado. A indústria farmacêutica também evoluiu bastante devido ao recurso a plantas, uma vez que muitas vezes utiliza como modelo base moléculas de origem vegetal para a síntese de novos fármacos.¹

A forma mais utilizada para consumo e tratamento com plantas medicinais é através de infusões, designa-se por infusão uma bebida feita à base de água a ferver onde são submergidas as plantas. As infusões surgiram na China há cerca de 5000 anos onde era utilizadas para fins terapêuticos. A água a ferver vai extrair compostos existentes nas plantas, os fitoquímicos, sendo estes compostos os responsáveis pelas atividades biológicas das infusões. Designa-se por fitoquímicos compostos não-nutrientes bioativos presentes em materiais vegetais, como frutas, vegetais e plantas medicinais.^{6, 7}

1.2. Problemática

No seguimento de uma dissertação de mestrado intitulada “Identificação de compostos com actividade antioxidante da acetilcolinesterase em extratos de espécies de *Plectranthus*” realizada no laboratório do grupo de Espectrometria de Massa do Centro de Química e Bioquímica da FCUL, decidiu-se investir no estudo de atividades biológicas de novas variedades do género *Plectranthus* e de algumas espécies já estudadas uma vez que estas plantas são referenciadas na bibliografia por possuírem potencial terapêutico e medicinal.

O género *Plectranthus* possui espécies que são referenciadas única e exclusivamente como ornamentais e outras que são indicadas para consumo. Assim achou-se importante o estudo de plantas pertencentes a ambos os grupos de forma a poder comparar resultados e perceber se existem espécies indicadas como ornamentais que poderiam ser alvo de um estudo mais aprofundado, de forma a proporcionar um avanço na área farmacêutica ou alimentar.

2. Objetivos

O género *Plectranthus* é referenciado na bibliografia por possuir inúmeras atividades biológicas e algumas são referenciados para possíveis fins terapêuticos na Ásia, África e América do Sul. Assim ao longo desta dissertação pretende-se contribuir para as respostas às seguintes questões:

- a) Qual a atividade biológica que justifica a ação benéfica destas plantas na doença de Alzheimer, na digestão e na ressaca.
- b) Se as decocções sofrem alterações durante o processo de digestão e se alguma das decocções testadas são citotóxicas.
- c) Saber se a presença de proteínas em conjunto com a decocção, possui influência nas atividades biológicas das mesmas decocções e se se pode desenvolver para aplicar na indústria.

Assim para responder à questão a) pretendeu-se:

- Determinar a constituição das decocções das diferentes espécies de *Plectranthus*;
- Determinar a capacidade de inibição do enzima acetilcolinesterase;
- Determinar a capacidade de inibição do enzima álcool desidrogenase;
- Determinar a capacidade antioxidante.

Para responder à questão b) pretendeu-se:

- Determinar se as decocções são citotóxicas;
- Compreender se as decocções são alteradas ao longo do sistema digestivo.

Finalmente, para responder à questão c) pretendeu-se:

- Compreender se estas decocções possuem influência na estrutura de proteínas;
- Compreender se a presença de proteínas em solução afeta as atividades biológicas das decocções.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Espécies de *Plectranthus*: etnobotânica, composição química e atividades biológicas

3.1.1. O gênero *Plectranthus* e o ácido rosmarínico

O gênero *Plectranthus* L'Herit pertence à família das Lamiaceae, à subfamília Nepetoideae, à tribo Ocimeae e à subtribo Plectranthinae.⁸⁻¹² Este gênero contém cerca de 300 espécies, sendo a maior parte delas originárias da África, Ásia, Austrália e algumas Ilhas do Pacífico, contudo é muito difícil a identificação das espécies uma vez que a morfologia nem sempre é muito distinta. A maioria destas espécies são apenas ornamentais (*P. madagascariensis*, *P. zuluensis* e *P. verticillatus* “Barborton”) contudo algumas delas também são utilizadas na medicina tradicional como é o caso do *P. barbatus*. Este gênero é muito rico em compostos, sendo que os compostos que possuem na sua constituição são diferentes consoante a espécie a que pertencem. Normalmente possuem na sua constituição diterpenóides, sendo este o grupo mais abundante, flavonóides, ácidos e éster fenólicos.^{8-10, 13-15}

O uso destas espécies na medicina tradicional deve-se às suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antimicrobianas e antioxidantes, derivadas do seu conteúdo rico em componentes fenólicos, diterpenóides, flavonóides e taninos.^{8, 10, 16}

De todas as espécies estudadas ao longo desta dissertação, o *P. barbatus* é a espécie que possui mais aplicações etnobotânicas, sendo usado para tratar problemas digestivos, respiratórios, circulatórios, sensoriais, problemas de fígado, pele, infeções e febres, dores, cancro e para estimular o sistema imunitário. Este para além destas aplicações é também cozinhado e ingerido como se de um vegetal se tratasse. O *P. gradidentatus* possui uma atividade antiproliferativa em linfócitos humanos, sendo assim utilizado para tratar doenças sanguíneas.^{9, 17} O *P. madagascariensis*, ultimamente tem sido alvo de estudos etnobotânicos, sendo este indicado tratar problemas respiratórios e doenças de pele. Já o uso do *P. neochilus* na etnobotânica também é recente, sendo utilizado para tratamento de infeções respiratórias e de pele na África do Sul, no Brasil é utilizado para problemas digestivos e insuficiência hepática.¹⁷⁻¹⁹

O ácido rosmarínico é o componente característico do gênero Lamiaceae, a sua estrutura molecular encontra-se apresentada na **Figura 1**. Este composto tem origem na via do

fenilpropanóide, a fenilalanina é transformada em ácido hidroxicinâmico através de enzimas, pertence à família dos derivados de ácido cafeico que muitas vezes é englobado na família dos taninos.²⁰

A família dos derivados de ácido cafeico possui um espectro muito característico, sendo possível distinguir membros desta família através do espectro UV-Vis. O ácido rosmarínico possui alguma atividade biológica, como capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antimutagénica e adstringente. A sua atividade anti-inflamatória é baseada na capacidade inibitória dos enzimas cicloxigenases e lipoxigenases e na sua capacidade de interferir nas cascatas enzimáticas em que estão envolvidos estes enzimas. O ácido rosmarínico após ser absorvido é rapidamente eliminado da circulação sanguínea.²⁰

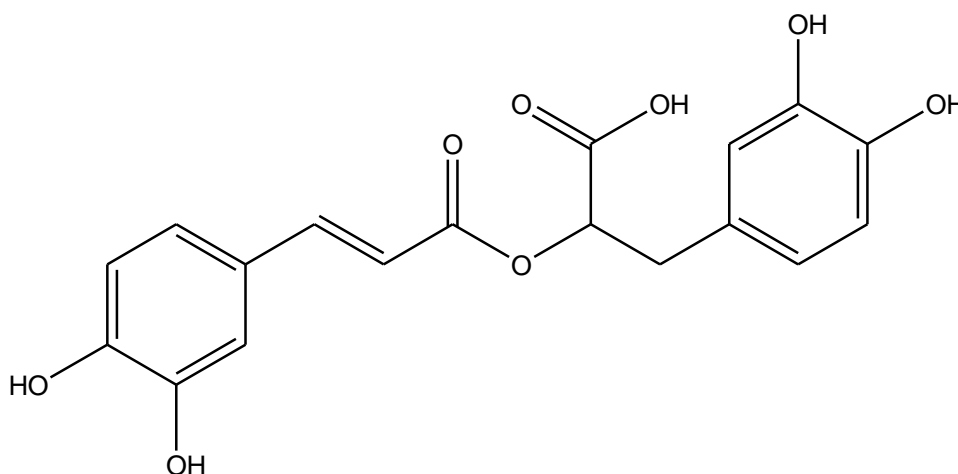


Figura 1. Esquema da molécula de ácido rosmarínico.

3.1.1.1. Constituintes das decocções – Compostos fenólicos (flavonóides, taninos, fenóis)

Desde há muito tempo que os cientistas apresentam um grande interesse nos compostos fenólicos ou polifenóis. Os polifenóis consistem em metabolitos secundários das plantas, entre estes encontram-se os fenóis simples, ácidos fenólicos, benzoquinonas, ácidos hidroxâmicos, cumarinas, xantonas, flavonóides, lignanos e neolignanos, ligninas entre outros. Estes podem derivar de duas vias metabólicas distintas, a via do ácido chiquimico e a via do acetato.²¹

Os compostos fenólicos existentes na alimentação são muitas vezes os responsáveis pelas qualidades nutricionais e sensoriais dos vegetais. Estes compostos são absorvidos no trato gastrointestinal, sendo que a sua estrutura química e a sua conjugação com outras moléculas

em que zona deste irão ser absorvidos. A grande maioria dos polifenóis são absorvidos no intestino, já que muitos deles são hidrolisados no meio ácido do estômago. Após a sua absorção, têm que ser metabolizados, este metabolismo é levado a cabo essencialmente pelo fígado, através da glucoronização, metilação e sulfatação, sendo que os rins e a mucosa intestinal também pode estar envolvidos no seu metabolismo.^{18, 21}

Flavonóides

Os flavonóides são o grupo de compostos fenólicos em que os cientistas mais se centram e assim sendo mais importante. Possui 13 subclasses: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas, flavonóis, dihidroflavonóis, flavanonas, flavanóis, flavadióis, antocianidinas, isoflavonóides, biflavanóides e protoantocianidinas. Destas subclasses todas elas possuem derivações da mesma estrutura principal (**Figura 2**). Os flavonóides apesar de existirem em grande quantidade nas plantas, muitas vezes encontram-se agregados a derivados glicosídicos, sendo a estrutura principal do flavonóide muitas vezes descrita como aglicona.²¹

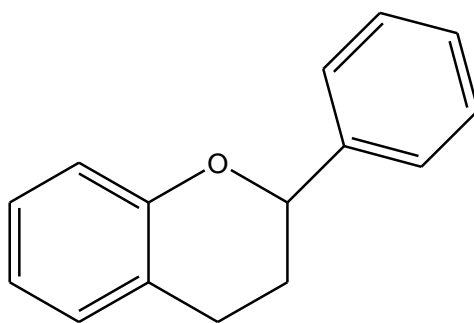


Figura 2. Estrutura básica de flavonóides.²¹

Taninos

Os taninos são normalmente moléculas de grande peso molecular (entre 500 e 5000 Da), que possuem um grande número de hidroxilações e podem formar agregados insolúveis com proteínas e glúcidos. Esta agregação com proteínas dá a sensação de adstringência quando se ingere alimentos ricos em taninos. Podem ser subdivididos em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.²¹⁻²³

Os taninos hidrolisáveis consistem numa molécula de ácido gálico (**Figura 3**) ou de ácido hexahidroxidifénico (precursor do ácido elágico, **Figura 4**) conjugada com moléculas de glucose. Dentro dos taninos condensados, estes podem ser subdivididos em duas categorias: galotaninos

(taninos conjugados com uma molécula de ácido gálico, **Figura 3**) e elagitaninos (taninos conjugados com uma molécula de ácido elágico, **Figura 4**).²¹⁻²⁴

Os taninos condensados consistem em associações de moléculas de flavan-3-ol conjugada com moléculas de flavan-3,4-diol ou com moléculas de leuconantocianidina. Estes últimos normalmente tem massa molecular superior aos taninos hidrolisáveis. Para além destes taninos, existem também os taninos complexos que consistem em associações de taninos hidrolisáveis e condensados.²¹⁻²³

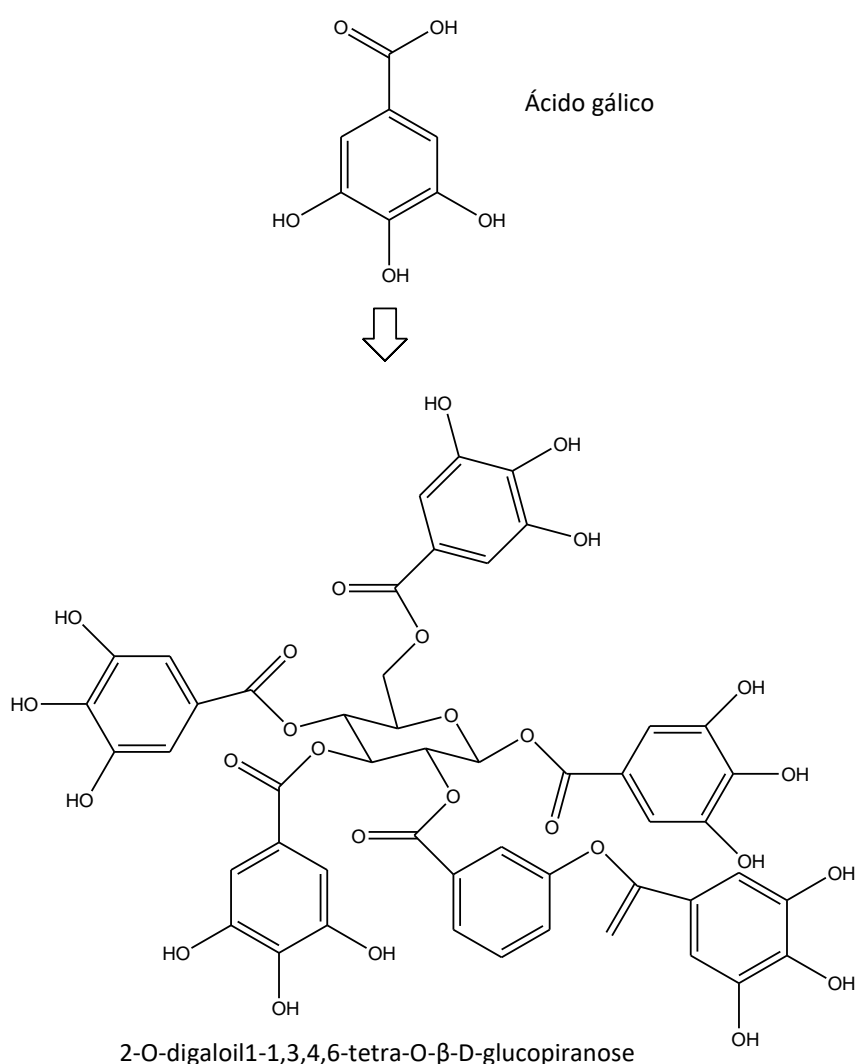


Figura 3. Molécula de ácido gálico e exemplo de um galotanino. [adaptado de Peñarrieta *et al.* em 2014]²⁴

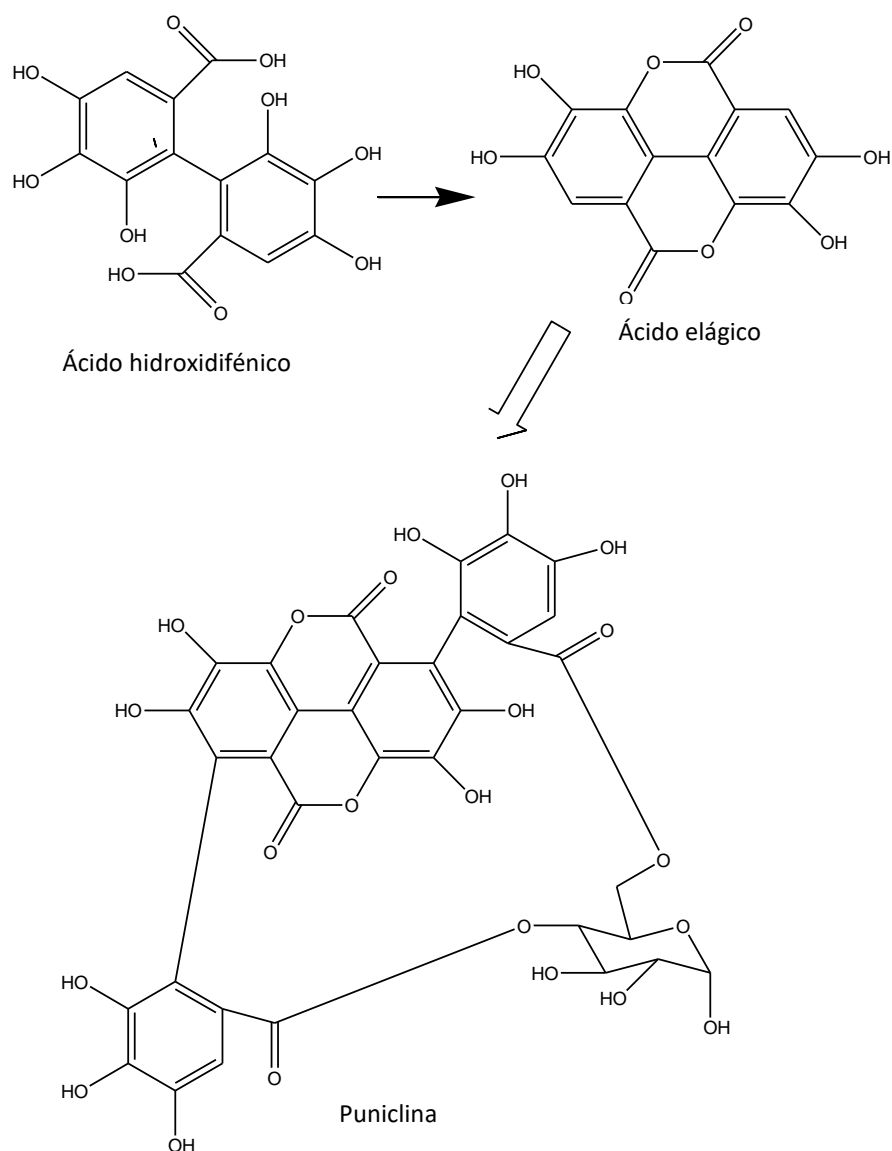


Figura 4. Molécula de ácido hidroxidifênico e elágico, e exemplo de um elagitanino. [adaptado de Peñarrieta *et al.* em 2014]²⁴

3.1.2. Atividades biológicas

3.1.2.1. Inibição do enzima acetilcolinesterase

O enzima acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7, abreviadamente AChE) tem sido alvo de um grande interesse dos cientistas uma vez que está envolvido na doença de Alzheimer.

Este enzima encontra-se ligado extrinsecamente à membrana do neurónio. É o responsável por catalisar a hidrólise da ligação éster existente na molécula de acetilcolina, apesar de também existir outro enzima que catalisa esta reação, o butirilcolinesterase (BuChE). A acetilcolina é um neurotransmissor envolvido nas sinapses colinérgicas, com a degradação deste neurotransmissor a propagação do impulso nervoso é interrompida. Este sistema de propagação do impulso nervoso é crucial para o funcionamento correto do organismo, se a neurotransmissão mediada pela acetilcolina cessar totalmente os efeitos são letais.^{15, 25-30}

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa em que ocorre uma perda gradual das sinapses acetilcolinérgicas e uma perda progressiva das capacidades cognitivas do paciente. Assim, começaram-se a utilizar inibidores do enzima acetilcolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. Existem dois tipos de inibidores da acetilcolinesterase, os reversíveis e os irreversíveis. Os inibidores irreversíveis foram muitos deles sintetizados pelo ser humano, sendo extremamente tóxicos. Devido a este facto apenas os inibidores reversíveis deste enzima são utilizados como tratamento para esta doença. Estes inibidores promovem a melhoria do estado de memória e dos defeitos cognitivos dos pacientes uma vez que a degradação da acetilcolina encontra-se diminuída. Em 2006, os medicamentos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration* nos Estados Unidos da América) tinha apenas aprovado a tacrina, o donezepil, rivastigmina e galantamina para o tratamento do Alzheimer, sendo todos eles inibidores reversíveis do enzima acetilcolinesterase.^{25, 26, 28-32}

Na natureza também é fácil encontrar inibidores deste enzima, muitos deles existem em plantas, um dos primeiros identificado como sendo um inibidor reversível do AChE é huperzina A, isolado da planta *Huperzia serrata* em 1986.^{25, 26, 32}

A acetilcolinesterase também está envolvida na digestão uma vez que alterações no metabolismo colinérgico está associado ao controlo do músculo liso e ao correto desempenho da função das mucosas intestinais, sendo que a acetilcolina é a principal responsável pela indução das contrações peristálticas. Para além destas funções a acetilcolina também está envolvida no controlo de transporte de iões e no controlo da hidratação das mucosas intestinais. Perturbações no sistema digestivo também são muitas vezes tratadas com inibidores reversíveis do enzima acetilcolinesterase, como é o caso de dores abdominais, vômito entre outras.^{25, 26}

Ellman *et al.* estabeleceram um método colorimétrico de modo a quantificar a cinética deste enzima.^{25, 26} Ao longo dos tempos, este método tem sido um dos mais utilizados na investigação contra o Alzheimer. Falé *et al.* realizou variadíssimos estudos em que testou a capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase utilizando diferentes plantas, entre elas: *Cynara cardunculus*, *Fraxinus angustifolia* e *Pterospartum tridentatum* (em 2013), diferentes espécies de menta (*Mentha x piperita*, *M. spicata*, *M. pulegium*, também em 2013), da espécie *Peumus boldus* (em 2012), de diferentes espécies de *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. lanuginosus* e *P. verticillatus* “Barborton” em 2009), sendo que todas apresentaram alguma atividade inibitória.^{25, 26, 33-36} Kubínová *et al.* em 2013, testou os constituintes existentes em extratos metanólicos de *P. madagascariensis*, entre eles o ácido rosmarínico, e verificou que todos os componentes testados apresentavam capacidade inibitória.²⁷ Ingkaninan *et al.* em 2003, testou várias plantas como remédios utilizadas na Tailândia em extração metanólica e percebeu que as raízes de *Stephania suberosa* Forman. e *Tabernaemontana divaricata* (L.) possuíam uma percentagem de inibição de 90 % numa solução de 0,1 mg/mL, para além destas duas plantas outras também foram testadas.³⁷

3.1.2.2. Álcool desidrogenase e o metabolismo do álcool

O álcool pode ser metabolizado de duas formas: a forma oxidativa e a forma não oxidativa no fígado, a forma oxidativa pode ocorrer devido a três enzimas (álcool desidrogenase, citocromo P450 e catalase), já o metabolismo não-oxidativo ocorre devido ao éster de etilo de ácido gordo sintase produzindo ésteres de etilo de ácidos gordos.³⁸

Estes enzimas são os primeiros enzimas da via metabólica de degradação do etanol, após o etanol ser transformado em acetaldeído pelo álcool desidrogenase (fígado), citocromo P450 (isoforma CYP2E1 no fígado) e catalase (peroxissomas), o acetaldeído é degradado a acetato pelo aldeído desidrogenase (**Figura 5**).³⁹

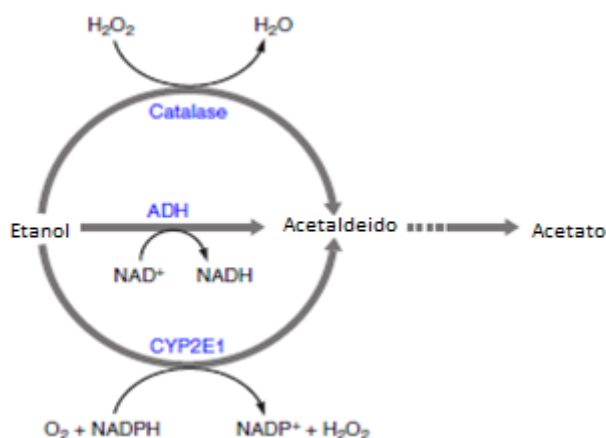


Figura 5. Esquema abreviado da via metabólica do etanol. [adaptado de Dorokhov *et al.* (2015)]⁴⁰

O álcool desidrogenase catalisa a interconversão de álcoois em aldeídos, contudo este enzima para além de ser capaz de catalisar a oxidação de álcoois a aldeídos, é capaz de catalisar também a oxidação de aldeídos a carboxilatos. Este enzima pode ser de dois tipos, cada tipo pertencendo a uma família proteica diferente: família de cadeia média (que inclui a forma hepática clássica e o enzima proveniente de leveduras) e a de cadeia curta a que inclui o enzima proveniente de insetos. A família de cadeia média possui aproximadamente 370 resíduos de aminoácidos, formando um dímero ou tetrâmero contendo um átomo de zinco no centro ativo. Estes enzimas podem ser dependentes tanto de NAD^+ (EC 1.1.1.1) como de NADP^+ (EC 1.1.1.2) e possuir uma especificidade de substrato.³⁹

A *Saccharomyces cerevisiae* possui dois tipos de álcool desidrogenase, a isoforma fermentativa ou I que através de uma oxidação origina NADH e acetaldeído e a isoforma II que é regulada negativamente pela glucose e pode funcionar como agente oxidante do etanol, esta última possui um K_m inferior ao da isoforma I. Estas duas isoformas diferem no local de ligação do álcool, aparentemente este liga-se à posição 294, no álcool desidrogenase I esta posição corresponde a uma metionina enquanto que na isoforma II corresponde a uma leucina. O grupo metilo extra dá a diferente especificidade.

A isoforma III (isoforma mitocondrial na *saccharomyces cerevisiae*) possui também uma leucina na posição 294, já na *schizosaccharomyces pombe* possui uma metionina.⁴¹

O metabolismo do etanol possui alguns efeitos adversos: a acumulação de acetaldeído provoca os sinais de ressaca tal como dores de cabeça, náuseas, vômitos, sede, tonturas e vertigens. O acetaldeído é também referenciado como potencialmente mutagénico, tóxico e carcinogénico,

uma vez que possui atividade biológica forte. A concentração de acetaldeído no sangue é controlada tanto pelo ADH, catalase e citocromo P450 como pelo enzima aldeído desidrogenase (ALDH).^{42, 43}

Os agentes quelantes de metais são agentes inibidores deste tipo de enzimas uma vez que causam alterações na estrutura proteica do enzima já que este possui zinco no seu centro ativo. A baixas temperaturas a atividade enzimática também é reduzida. Certos alimentos também podem afetar o metabolismo do etanol, a frutose é exemplo de um acelerador deste metabolismo já os polifenóis podem diminuir-lo.^{39, 43, 44}

O álcool desidrogenase do fígado humano é uma proteína dimérica, em que cada subunidade possui 40000 Da e 4 g de átomos de Zn^{2+} por cada 80000 Da. Este enzima segue a cinética de Michaelis-Menten para qualquer substrato.⁴⁵

Alguns autores investigaram a capacidade inibitória de alguns polifenóis isolados no enzima álcool desidrogenase, chegando à conclusão de que alguns possuem uma boa capacidade inibitória. M. M. Manir *et al.* em 2012, percebeu que a cafeína não possuía uma boa capacidade inibitória do ADH, ao contrário da epigallocatequina e da 3-galato-epigallocatequina.⁴² Já Haseba *et al.* em 2008 testaram a valina, ácido cafeico e elágico e verificaram que todos eram fortes inibidores do enzima álcool desidrogenase.⁴⁵ Tsigos *et al.* realizou um estudo sobre inibidores deste enzima seriam quelantes do átomo de zinco existente no centro ativo do enzima, sendo o melhor inibidor testado o cloreto de cobre.³⁹

3.1.2.3. Capacidade antioxidante

O processo de autooxidação dos alimentos é um processo radicalar que ocorre em cadeia, este processo ocorre em três fases: indução, propagação e terminação. A fase de iniciação caracteriza-se pela formação de um radical alquilo, após esta fase segue-se a fase de propagação que consiste numa sequência de reações que envolvem moléculas de oxigênio de modo a existir a formação de radicais peróxidos e hidroperóxidos. Na fase de terminação ocorre a associação de dois radicais, cessando assim a sequência de reações. Na indústria alimentar, muitas vezes são adicionados compostos antioxidantes de modo a combater este processo. Designam-se por antioxidantes os compostos que reagem primeiro com os radicais livres, perdendo os elétrons.⁴⁶

No organismo também ocorrem processos de oxidação e a produção de radicais, quando existe um desequilíbrio das condições homeostáticas devido ao aumento da concentração de radicais de oxigénio podem surgir várias patologias, entre elas encontra-se a asma, a carcinogénese, diabetes e doenças neurodegenerativas.⁴⁷

A maioria das plantas apresenta alguma capacidade antioxidante, isto deve-se aos compostos fenólicos presentes. Para além destes possuírem capacidade antioxidante, apresentam também propriedades antimutagénicas e são sequestradores de radicais livres. Os compostos fenólicos sequestram os radicais livres impedindo que estes reajam com membranas, sendo capaz de doar um dos seus hidrogénios aos radicais livres, impedindo que estes gerem outros radicais livres. O radical fenólico gerado é uma molécula estável. A capacidade antioxidante do composto depende essencialmente da estrutura química do mesmo, se o composto fenólico se encontrar glicosilado a sua capacidade antioxidante é inferior à capacidade antioxidante da aglicona deste mesmo composto. O grupo dos flavonóides é o grupo dos compostos fenólicos que possuem maior capacidade antioxidante. A dificuldade de absorção destes compostos permite que estes compostos protejam as proteínas, lípidos e glúcidos durante a digestão através da sua capacidade antioxidante.^{21, 48}

A família Lamiaceae tem sido intensamente estudada ao longo dos tempos, Magesh *et al.* testou as espécies *Mentha spicata*, *Ocimum santum* e *Plectranthus amboinicus* e verificou que todas as espécies possuíam alguma capacidade antioxidante sendo que a Gülçin *et al.* em 2012, testou cinco espécies de *Plectranthus* (*P. hadiensis*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e *P. barbatus*) utilizando diferentes tipos de extração, a maioria dos extratos apresentou capacidade antioxidante, exceto o *P. hadiensis*.⁴⁹

Falé *et al.* avaliou a capacidade antioxidante de várias plantas, entre elas: *Cynara cardunculus*, *Fraxinus angustifolia* e *Pterospartum tridentatum* (em 2013), diferentes espécies de menta (*Mentha x piperita*, *M. spicata*, *M. pulegium*, também em 2013), da espécie *Peumus boldus* (em 2012), de diferentes espécies de *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. lanuginosus* e *P. verticillatus* em 2009), sendo que todas as plantas apresentaram capacidade antioxidante.^{25, 26, 33-35}

3.2. Influência de decocções de *P. barbatus* e *P. zuluensis* na estrutura de proteínas

3.2.1. Influência de compostos fenólicos e da temperatura em proteínas

Os compostos fenólicos têm uma grande capacidade em associar-se a proteínas e a precipitá-las, contudo, esta sua capacidade depende muito do seu grau de hidroxilação, do seu peso molecular e se possuem ou não glicósidos associados. Dos compostos fenólicos referidos anteriormente os que possuem maior capacidade de precipitar proteínas são efetivamente os taninos, sendo que interagem com as proteínas através de ligações de hidrogénio e interações hidrófobas. Quanto maior o tamanho molecular dos taninos maior a afinidade que estes têm para proteínas, sendo que estes inibem a dimerização de proteínas devido à sua grande massa molecular. Devido ao facto de os taninos possuírem a capacidade de precipitar proteínas, estes são muitas vezes designados como antinutrientes uma vez que diminuem a digestibilidade das proteínas. Já os compostos fenólicos simples, como o timol, não apresentam qualquer capacidade de precipitar proteínas. Os taninos para além de possuírem esta capacidade *in vitro*, precipitam-nas também *in vivo* no interior do trato intestinal impedindo assim a sua digestão. As proteínas da saliva são muito sensíveis aos polifenóis devido ao facto de serem muito ricas em prolinas, e apresentarem uma elevada afinidade para os polifenóis.^{21-23, 50} As proteínas são muito sensíveis a variações de temperatura, contudo para não existir uma desnaturação térmica, a energia de ligação das ligações de hidrogénio tem que ser superior energia térmica. Se estas ligações de hidrogénio forem quebradas, a proteína perde a sua estrutura secundária e terciária e ocorre a desnaturação.⁵¹

Os polifenóis e a temperatura para além de poderem potenciar a desnaturação de proteínas podem ainda influenciar de outro modo, potenciando a agregação entre proteínas, sendo que o fator temperatura é o mais importante para este acontecimento. A agregação de proteínas apesar de ser um processo que acontece *in vivo*, normalmente não tem um efeito benéfico, as atividades biológicas das proteínas são afetadas por esta agregação, sendo que muitas vezes perdem de todo a sua atividade.⁵² No caso da doença de Alzheimer existe a agregação de proteínas e a consequente formação de placas amiloides que impedem que estas tenham a sua função e o correto funcionamento celular induzindo a morte da própria célula.⁵³ No que toca à agregação de moléculas de proteínas do soro, como a albumina, prejudica gravemente a distribuição de fármacos ao longo do organismo, uma vez que esta proteína é a principal

responsável por esta função.⁵² Cada proteína possui uma temperatura de desnaturação própria que depende da sua própria constituição e do local onde a proteína atua. A albumina de soro bovino (BSA) sofre desnaturação a partir de 60 °C, já a miosina só sofre agregação a temperaturas superiores a 50 °C. Mas o processo de desnaturação da BSA não é linear passando por vários estados, temperaturas até aos 40 °C a BSA não sofre qualquer efeito da temperatura, contudo entre as temperaturas de 42-50 °C a proteína sofre alterações conformacionais reversíveis. Já na gama de temperatura entre 52-60 °C as alterações conformacionais são permanentes, ocorrendo o *unfold* das hélices- α , temperaturas superiores a 60 °C dá-se o *unfold* completo da proteína e inicia-se o processo de agregação através de folhas- β , sendo que temperaturas superiores a 70 °C induzem a gelatinização da proteína devido ao seu grau de *unfolding* (principalmente em ambientes aquosos).⁵⁴

Para o estudo das alterações conformacionais de proteínas uma das técnicas mais utilizadas é a espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FT-IR), dicromismo circular (CD) e a eletroforese.

Kajak-Siemaszko *et al.* estudaram o processo de agregação de proteínas com variações de temperatura, e perceberam que quanto maior a temperatura a que a proteína é sujeita e quanto maior o tempo de aquecimento maior a agregação existente (principalmente no caso da BSA).⁵² Murayama *et al.* (2004) também estudaram o efeito da temperatura na estrutura da BSA e chegaram à conclusão de que a formação de folhas- β intermoleculares irreversíveis ocorrem a temperaturas superiores a 70 °C e que estes resultados são perfeitamente observáveis nos gráficos de FT-IR ao número de onda de 1615 cm⁻¹.⁵⁴ Já Maruyama *et al.* em 2001 estudaram o processo de agregação da BSA durante ultrafiltração e observaram que o número de folhas- β aumentava consoante o aumento de agregação das proteínas.⁵⁵ Para além de estudos e variação de temperaturas, também é possível encontrar variadíssimos estudos na bibliografia sobre a influência de polifenóis na estrutura de proteínas e também da atuação conjunta da temperatura e polifenóis. Hoffmann *et al.* em 2006 afirmaram que a precipitação de BSA sob a ação de derivados de procianidina não é influenciada por variações de temperatura, pelo contrário, Prigent *et al.* em 2003 chegaram à conclusão de que o aumento de temperatura causava o decréscimo da afinidade de ligação do ácido clorogénico para a BSA.⁵⁶⁻⁵⁸

Mas a associação proteína-fenóis não é só prejudicial para as proteínas, este efeito nefasto também se verifica para as atividades dos polifenóis. Muitas das atividades biológicas atribuídas aos polifenóis são perdidas com a associação de proteínas-polifenóis, como é o caso da atividade

antimicrobiana (segundo Von Staszewski, Pilosof e Jagus em 2011). A capacidade antioxidante dos polifenóis também pode sofrer algumas alterações, contudo estas alterações dependem do método utilizado para quantificação. Zorilla *et. al* em 2011 verificou que a capacidade antioxidantes da 3-galato-epigallocatequina não é afetada na presença de proteínas, mesmo que estas últimas sofram desnaturação.⁵⁸⁻⁶⁰

Em 2011, foi realizado um estudo de FT-IR e fluorescência sobre a estrutura proteica da HSA com a decocção de *P. barbatus* por Falé *et al.*. Falé e os seus colaboradores chegaram à conclusão de que a estrutura secundária não sofre alterações, o que não se verifica no caso da estrutura terciária. A ligação dos polifenóis, como é o caso do ácido rosmarínico, à proteína é feita por interações fracas o que afeta apenas a estrutura terciária da HSA.⁶¹

4. Procedimento Experimental

4.1. Materiais

4.1.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado ao longo deste trabalho foi recolhido no Jardim Botânico da Universidade de Lisboa, estando todos identificados e possuindo os seguintes LISU:

P. barbatus Andr. – LISU: 214625

P. ernstii Codd – LISU: 261631

P. gradidentatus Gürke – LISU: 214628

P. lanuginosus (Benth.) Agnew – LISU: 177258

P. madagascarensis (Pers.) Benth var “Lynne” – LISU: 261633

P. neochilus Schltr – LISU: 177257

P. verticillatus (L.f.) Druce var. “Barborton” – LISU: 261634

P. verticillatus (L.f.) Druce var. “Ubombo” – LISU: 261628

P. venteri Van Jaarsy & Hankey – LISU: 261629

P. zuluensis T. Cooke – LISU: 261630

4.1.2. Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas nos ensaios foram HepG2 (ATCC®HB-8065) e MCF-7 (ATCC®HTB-22), sendo linhas celulares derivadas de adenocarcinoma hepatocelular e adenocarcinoma mamário.

4.1.3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados ao longo de todo este trabalho encontram-se enunciados na **Tabela 1.**

Tabela 1. Tabela de reagentes.

Ensaio	Reagente	Marca
HPLC	Metanol	Merck®
	Ácido trifluoroacético	Merck®
	Ácido fórmico	Merck®
	Ácido Rosmarínico	Sigma®
Atividades Biológicas	5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)	Sigma®
	Iodeto de acetilticolina	Sigma®
	Tris	Sigma®
	Acetilcolinesterase	Sigma®
	Cloreto de sódio	Panreac®
	Cloreto de magnésio hexa-hidratado	Panreac®
	Álcool desidrogenase	Sigma®
	NAD ⁺	Sigma®
	Álcool absoluto	Carlo Erba®
	Cloreto de cálcio	Merck®
	Cloreto de cobre	Merck®
	Ácido Rosmarínico	Sigma®
	DPPH	Sigma®
	Metanol	Merck®
	Pepsina	Fluka®
	Pancreatina	Sigma®
	Dihidrogenofosfato de sódio	Merck®
	Hidrogenofosfato di-sódio	Panreac®
	Cloreto de potássio	Fluka®
	Ácido gálico	Sigma®
	Ácido tânico	Merck®
	Reagente de Folin-Ciocalteu	Sigma®
	Carbonato de sódio	Merck®
	Cloreto de ferro (III)	Fluka®
	Hidróxido de sódio	J.T.Baker®
	Ácido clorídrico	Panreac®
	Ferrocianeto de potássio	Merck®
Ensaio celulares	MTT	Sigma®
	DMEM	Lonza®
	FBS	Lonza®
	Pen-strep	Lonza®
	Glutamina	Lonza®
	Tripsina	Lonza®
	DMSO	Fisher Scientific®
	Azul de tripano	Sigma®
	Cloreto de sódio	Panreac®

	Cloreto de potássio	Fluka®
	Hidrogenofosfato di-sódio	Panreac®
	Dihidrogenofosfato de potássio	Merck®
FT-IR	BSA fração V	Sigma®
	Cloreto de sódio	Panreac®
	Cloreto de potássio	Fluka®
	Hidrogenofosfato di-sódio	Panreac®
	Dihidrogenofosfato de potássio	Merck®
Eletroforese	Azul de bromofenol	Merck®
	Azul de Comassie R-250	Bio-RAD®
	Acrilamida/Bisacrilamida 29:1	Amresco®
	Ácido acético glacial	Merck®
	TEMED	Merck®
	Metanol	Merck®
	Glicerol	Promega®
	Glicina	Sigma®
	Persulfato de amónio	Sigma®
	Tris	Sigma®
	Ácido Clorídrico	Panreac®
	BSA fração V	Sigma®

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação de extratos

A preparação dos extratos consistiu na realização de decocções para as diferentes plantas do género *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ernstii*, *P. gradidentatus*, *P. lanuginosus*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e “Ubombo”, *P. venterii*, *P. zuluensis*), usando 10 mL de água destilada para cada grama de folhas e caules de cada planta. Primeiramente colocou-se em ebulição e posteriormente adicionou-se as folhas e os caules de cada planta, após esta adição a água esteve em ebulição durante 10 minutos de modo a proceder à extração dos compostos existentes nas folhas e nos caules. Seguidamente, estes extratos foram filtrados em papel de filtro Whatman 1, congelados a -20 °C e posteriormente liofilizados, de modo a eliminar toda a água presente, usando o aparelho Heto® PowerDry 3000.²⁵

4.2.2. Quantificação de taninos

Para determinar a quantidade de taninos existente nas amostras de *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ernstii*, *P. gradidentatus*, *P. lanuginosus*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e “Ubombo”, *P. venterii*, *P. zuluensis*) utilizou-se uma mistura reacional composta por 300 µL de água destilada, 100 µL de extrato (1 mg/mL), 300 µL de cloreto de ferro (III) 0,1 M (FeCl_3 diluído em HCl 0,1 M) e 300 µL de ferricianeto de potássio ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$).⁶² Todas as amostras foram realizadas em triplicado e absorvência foi lida a 605 nm. Como padrão para este ensaio foi utilizado o ácido tânico, com o qual foi traçada uma reta de calibração:

$$y = 0,0552x + 0,1192 \quad [\text{Eq.1}]$$

Sendo y a absorvência obtida e x a concentração de equivalentes de ácido tânico. O espectrofotômetro utilizado foi um espectrofotômetro multicanal leitor de microplacas Tecan® Sunrise.

4.2.3. Quantificação de fenóis totais

Para determinar a quantidade de fenóis existente nas amostras utilizou-se o método de Oktay *et al.* (2007) com algumas adaptações. Este método utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu como base para a detecção de fenóis totais. Os átomos de molibdênio presentes no reagente de Folin-Ciocalteu vão ser reduzidos por eletrões provenientes de compostos fenólicos ou outros compostos existentes na amostra quando estes estão sujeitos ao meio alcalino onde ocorre a reação. A redução do molibdênio forma um complexo azul que é possível ser quantificado espectrofotometricamente. A mistura reacional foi constituída por 1350 µL de água destilada, 30 µL de extrato (1 mg/mL), 30 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e aguardou-se 3 min, de seguida adicionou-se 90 µL de carbonato de sódio a 2% e esperou-se 2 horas em agitação. De seguida foi medida a absorvência a 760 nm e todas as amostras foram realizadas em triplicado.^{47, 63} Como padrão para este método utilizamos o ácido gálico e traçou-se uma reta de calibração:

$$y = 0,0693x - 0,0394 \quad [\text{Eq.2}]$$

Sendo y a absorvência obtida e x a concentração de equivalentes de ácido gálico. O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer e os reagentes encontram-se na **Tabela 1**.

4.2.4. Análise cromatográfica por HPLC- RP-DAD

As decocções são muitas vezes caracterizadas com recurso a técnicas cromatográficas, sendo uma delas o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Esta técnica também é muitas vezes um recurso usado por indústrias farmacêuticas e alimentares de modo a caracterizar as suas amostras. Para além de ser possível caracterizar uma mistura de compostos, é também usual utilizar esta técnica para separar, isolar e quantificar os compostos existentes nessa mistura. O HPLC é das técnicas mais usadas em muitas indústrias uma vez que possui a vantagem de poder ser utilizado para compostos não voláteis e termolábeis e pode ainda ser acoplado a outras técnicas, como é o exemplo da espectrometria de massa.⁶⁴⁻⁶⁷

A cromatografia líquida é uma técnica que se baseia na separação de compostos devido às suas propriedades estruturais e de composição. Esta separação dá-se através da migração dos componentes, existentes na mistura a separar, na fase estacionária devido à ação da fase móvel. Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes desta distribuem-se entre as duas fases e são transportadas, mais ou menos lentamente consoante a sua afinidade com esta fase e a velocidade de eluição. Sendo que os componentes com a maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente.⁶⁴⁻⁶⁷ O eluente final pode ser recolhido em várias frações de forma a separar os vários componentes da amostra, consoante o seu tempo de retenção. Uma das desvantagens desta separação é que os compostos obtidos no final da corrida encontram-se muito diluídos. Após esta separação, as frações recolhidas podem ser utilizadas para identificação ou para outros ensaios laboratoriais uma vez que a técnica utilizada não é uma técnica destrutiva.⁶⁴⁻⁶⁶

4.2.4.1. Análise cromatográfica das decocções das diferentes espécies de *Plectranthus*

Para determinação da composição das decocções das várias espécies de *Plectranthus* procedeu-se à sua análise por HPLC-RP-DAD e por LC-MS no âmbito de trabalhos anteriores no grupo. No HPLC-RP-DAD as amostras foram separadas pelo método de gradiente de 30 minutos, toda a

descrição do método encontra-se enunciada na **Tabela 2**. Os eluentes utilizados foram metanol: água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) (0,05%) (A:B, respetivamente), o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. Os comprimentos de onda da análise variaram entre 200 e 500 nm.²⁵ Para além da análise das amostras realizou-se uma reta de calibração com ácido rosmarínico de forma a determinar a sua concentração em cada amostra. O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro VWR – Hitachi LaChrom Elite®, com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) da Merck® e os reagentes encontram-se na **Tabela 1**. O *software* utilizado para tratamento de resultados foi o *software* EZChrom Elite®.

A determinação da concentração do ácido rosmarínico foi realizada através de uma reta de calibração em que foi utilizado um padrão deste mesmo composto. A reta utilizada foi:

$$y = 8 \times 10^6 x + 197222 \quad [\text{Eq.3}]$$

Sendo *y* a absorvência obtida e *x* a concentração de ácido rosmarínico existente em cada extrato.

Tabela 2. Gradiente do método de HPLC para a identificação dos compostos.

Tempo (minutos)	% A	% B	Fluxo (mL/min)
0	20	80	1
20	80	20	
25	80	20	
28	20	80	
30	20	80	

4.2.4.2. Isolamento de frações da amostra de *P. zuluensis*

De modo a isolar frações da amostra de *P. zuluensis* procedeu-se à sua separação através de HPLC-RP-DAD. No HPLC-RP-DAD a amostra foi submetida a um gradiente que varia das condições 30:70 (A:B) até 70:30 em 90 minutos, sendo os eluentes metanol: água acidificada com ácido fórmico (0,1%) (A:B) e o fluxo utilizado foi de 0,3 mL/min. Os comprimentos de onda da análise variaram entre 200 e 500 nm. O gradiente do método encontra-se enunciado na **Tabela 3**. O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro VWR – Hitachi LaChrom Elite®, com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) da Merck® e os reagentes

encontram-se na **Tabela 1**. O *software* utilizado para tratamento de resultados foi o *software* EZChrom Elite®.

Tabela 3. Gradiente de HPLC usado para o isolamento de frações da amostra de *P. zuluensis*.

Tempo (minutos)	% A	% B	Fluxo (mL/min)
0	30	70	0,3
45	80	20	
46	99	1	
60	99	1	
61	30	70	
90	30	70	

Primeiramente determinaram-se as frações a isolar correndo a amostra no método acima descrito obtendo-se o cromatograma da **Figura 23**. Com base neste cromatograma, determinou-se que a fração 1F era composta pelos tempos de retenção de 0 a 30 minutos, a fração 2F pelos tempos de retenção de 30 a 32 minutos e a fração 3F pelos tempos de retenção de 32 a 90 minutos. Estas frações foram posteriormente evaporadas no evaporador rotativo Butchi® Rotavapor R-200 com um sistema de vácuo Butchi® B-169 a 40 °C e analisadas cromatograficamente pelo mesmo método de HPLC descrito na **Tabela 2** (fração 1F-R-F, fração 2F-R-F e fração 3F-R-F) e pelo método de HPLC descrito na **Tabela 3** (fração 1F-R-A, fração 2F-R-A e fração 3F-R-A).

Para além deste método foi também utilizado o método descrito na **Tabela 2** de modo a recolher frações, sendo a fração 1A composta pelos tempos de retenção de 0 a 13 minutos, a fração 2A pelos tempos de retenção de 13 a 16 minutos e a fração 3A pelos tempos de retenção de 16 a 30 minutos. Estas frações recolhidas foram subdivididas em três (fração 1A-L-A, fração 2A-L-A, fração 3A-E-A, fração 1A-R-A, fração 2A-R-A, fração 3A-R-A, fração 1A-N-A, fração 2A-N-A, fração 3A-N-A) e evaporadas de três formas diferentes: linha de azoto (E), evaporador rotativo a 40 °C (R) e liofilizador (L), as amostras com identificação N não sofreram qualquer tipo de evaporação, na **Tabela 11** é apresentada a nomenclatura das frações. Posteriormente todas estas amostras foram analisadas cromatograficamente pelo método utilizado para o isolamento de frações descrito na **Tabela 3**.

4.2.5. Análise da estrutura de proteínas por FT-IR

A espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FT-IR) é uma ferramenta muito útil na Química uma vez que permite a identificação de compostos através das ligações neles presentes. Como é uma técnica muito sensível o seu uso noutras áreas, como a Bioquímica, começou a ser frequente. A absorção da radiação infravermelha provoca a excitação do estado vibracional das moléculas dando origem a transições. As frequências destas vibrações dependem do comprimento e da polaridade das ligações vibrantes, sendo que estas são influenciadas pelos efeitos intra- e intermoleculares.⁶⁸

Através do FT-IR também é possível determinar estrutura de proteínas, uma vez que estas possuem bandas características a determinados números de onda (amida A, B e amida I-VII). Estas bandas são causadas pelos *stretching* e *bending* de certas ligações. As bandas das amidas A e B encontram-se entre 3310 e 3270 cm^{-1} , sendo o *stretching* das ligações NH o que causa o sinal nesta gama de número de onda. A banda da amida I encontra-se ao número de onda de 1655 cm^{-1} (sendo composta pela banda resultante do *stretch* da ligação C=O), esta é a que fornece mais informação acerca da estrutura secundária da proteína. Já a banda da amida II encontra-se a 1555 cm^{-1} e a amida III encontra-se a 1300 cm^{-1} (ambas resultantes do *bend* N-H e do *stretch* da ligação C-N), sendo estas as bandas mais utilizadas para determinar a estrutura de proteínas, essencialmente a banda da amida I. A decomposição da amida I fornece informação dos componentes que constituem a estrutura secundária (hélices- α , folhas- β , *turns* e *random coils*), na **Tabela 4** encontram-se enunciados os motivos estruturais com o respetivo número de onda.⁶⁹

Tabela 4. Tabela com motivos estruturais e respetivos números de onda na espectroscopia de FT-IR. ⁶⁹

Motivo Estrutural	Número de onda em água (cm^{-1})
Hélice- α	1648-1657
Folha β paralelas	1626-1640
Folha β anti-paralelas	1612-1640 1670-1690 (fraca)
<i>Turns</i>	1655-1675
<i>Random Coils</i>	1640-1651

Apesar da técnica de FT-IR ser muito útil no estudo de proteínas apresenta um problema, a água possui uma absorção 1650 cm^{-1} o que mascara a banda da amida I, nem sempre os valores de absorvência a 1650 cm^{-1} são reais devido à interferência da água. Muitas vezes utiliza-se água deuterada (D_2O) que não possui absorvência neste número de onda, sendo que os números de onda em que aparecem as bandas características das proteínas também são alteradas. Outra das técnicas que se utiliza para eliminar este problema é a subtração do espectro da água ao espectro da amostra quando a amostra é preparada em solução aquosa.⁷⁰

Para observar a influência das decocções dos extratos de *P. barbatus* e *P. zuluensis* foram preparadas soluções com diferentes proporções decocção:proteína (1:1, 1:2, 1:10). As amostras de FT-IR eram compostas por 560 μL de solução fosfato-salina a pH de 6,4 (PBS), 400 μL de extrato em diferentes concentrações (1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL) e 40 μL de uma solução de 10 % de BSA (ficando com a concentração final de BSA de 4 mg/mL). Como branco para estas amostras foram utilizadas diferentes soluções contendo 560 μL de PBS, 400 μL de água destilada e 40 μL de BSA a 10 % (ficando com a concentração final de 4 mg/mL). Todas as amostras foram submetidas ao efeito de diferentes temperaturas: 25 °C, 37 °C, 55 °C, 70 °C e 100 °C, sendo que primeiramente foram primeiro incubadas a 37 °C durante 15 minutos e só depois submetidas à temperatura de ensaio durante 15 minutos, exceto as amostras de 25 °C que sofreram incubação a 25 °C.⁷¹ Foram colocados 60 μL de cada amostra numa célula de CaF_2 e posteriormente secou-se sob um fluxo de N_2 . Os espectros de FT-IR foram realizados à temperatura ambiente com 200 varrimentos num aparelho Nicolet™ FT-IR spectrometers da Thermo Electron Corporations usando um detetor DTGSTECH, com uma gama de números de onda de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ e uma resolução de 4 cm^{-1} . Todos os ensaios foram realizados em triplicado e o vapor de água retirado usando o *software* OMNIC. Os espectros foram tratados e normalizados através de Matlab.

4.2.6. Análise da estrutura de proteínas por eletroforese nativa

A eletroforese é uma ferramenta essencial para se obter informação sobre o tamanho da proteína, massa molecular, se esta proteína é um monómero, um dímero, um trímero ou um tetrâmero, se a proteína monomérica se encontra agregada, se a proteína possui impurezas em

solução, isto claro, dependendo do tipo de eletroforese utilizada. Através de eletroforese também é possível separar proteínas, isola-las de forma a serem identificadas.⁷²

A técnica de eletroforese consiste na separação de proteínas carregadas numa matriz sob ação de uma corrente elétrica proveniente de elétrodos submergidos numa solução tampão. Neste caso a matriz que frequentemente é utilizada é a poliacrilamida. A eletroforese unidimensional SDS-PAGE desnaturante foi originalmente descrita por Laemmli e é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de proteínas segundo o seu tamanho.⁷²

A eletroforese nativa consiste na análise de proteínas aplicadas num gel não desnaturante, onde não são submetidas a condições desnaturantes, sendo assim possível analisá-las segundo as suas propriedades físico-químicas. Numa eletroforese nativa as proteínas são separadas segundo o seu tamanho e a sua carga, o que permite distinguir proteínas de tamanho semelhante. Neste tipo de eletroforese o sistema tampão utilizado é crucial para uma boa separação de proteínas uma vez que é este que garante as condições de pH a que a eletroforese decorre.^{72, 73}

Na eletroforese nativa realizada utilizou-se géis preparados num sistema da Bio-Rad “Mini-Protean 3 cell”, em que para o gel de concentração usou-se uma percentagem de 2,5 % de poliacrilamida e para o gel de separação usou-se percentagem de 7,5 %. Para a corrida de eletroforese foi utilizada uma voltagem de 100 V durante aproximadamente 2 horas. O tampão utilizado para a corrida de eletroforese foi o tampão tris 0,0025 M contendo 0,192 M de glicina a pH 8,3 acertado com HCl. Cada amostra foi misturada com igual de tampão contendo glicerol 43 % (v/v), azul de bromofenol a 0,5 % (p/v) e água 57 % (v/v). Após a corrida da eletroforese o gel foi corado com uma solução fixante contendo uma solução aquosa de azul de Comassie R-250 40 %, metanol 50 % e ácido acético glacial 10 %. Posteriormente os géis foram descorados com uma solução contendo ácido acético glacial 10 %, metanol 30 % e água destilada 60 %. As eletroforeses foram fotografadas com o aparelho ImageQuant LAS 500 da GE Healthcare Life Sciences®.

4.2.6.1. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada através de eletroforese nativa como descrito em “4.2.6. Análise da estrutura de proteínas por eletroforese nativa” aplicando em cada gel cinco

pontos de concentrações crescentes de BSA (1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL e 6 mg/mL) de forma a traçar uma reta de calibração. Para traçar as retas de calibração primeiramente foi necessário calcular as áreas das bandas existentes em cada gel através do *software* ImageJ®, utilizando-as para posteriormente traçar as respetivas retas, de modo a calcular as concentrações de BSA em cada amostra com base nas áreas das bandas existentes.

4.2.7. Simulação do metabolismo das decocções *in vitro* por ação de suco gástrico e suco pancreático

Para simular a digestão dos extratos submeteu-se estes à ação de suco gástrico e pancreático utilizando o método de Yamamoto *et al.* (1999) com algumas adaptações.²⁵ Para o metabolismo gástrico preparou-se primeiramente 100 mL de suco gástrico com 320 mg de pepsina e 200 mg de NaCl dissolvido em água destilada com o pH ajustado a 1,2 com HCl. A 2,5 mL deste suco gástrico adicionou-se 2,5 mL de extrato de cada *Plectranthus* dissolvido em água destilada numa concentração de 10 mg/mL. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 4 horas. Desta mistura foram recolhidas alíquotas de 100 µL aos tempos 0 horas, 2 horas e 4 horas, a estas alíquotas foram adicionados 900 µL de metanol. As alíquotas foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos e posteriormente os sobrenadantes analisados por HPLC com o método descrito anteriormente em “4.2.4.1. Análise cromatográfica das decocções das diferentes espécies de *Plectranthus*”. O branco deste ensaio foi constituído por 100 µL de suco gástrico com 900 µL de metanol submetido à mesma centrifugação.²⁵

Para o metabolismo pancreático preparou-se primeiramente o suco pancreático constituído por 250 mg de pancreatina dissolvida em 10 mL de tampão fosfato de potássio a 50 mM e pH 8. A 2,5 mL de suco pancreático adicionou-se 2,5 mL de extrato de cada *Plectranthus* dissolvido em água destilada numa concentração de 10 mg/mL. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 4 horas. Desta mistura foram recolhidas alíquotas de 100 µL aos tempos 0 horas, 2 horas e 4 horas, a estas alíquotas foram adicionados 900 µL de metanol. As alíquotas foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos e posteriormente os sobrenadantes analisados por HPLC com o método descrito anteriormente em “4.2.4.1. Análise cromatográfica das decocções das diferentes espécies de *Plectranthus*”. O branco deste ensaio foi constituído por 100 µL de suco pancreático com 900 µL de metanol submetido à mesma centrifugação. A centrífuga utilizada para a centrifugação das amostras foi uma Mini Spin F45-12-11 da *Eppendorf*®.

Para a análise cromatográfica o equipamento utilizado foi o espectrofotômetro VWR – Hitachi LaChrom Elite®, com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) da Merck® e os reagentes encontram-se na **Tabela 1**.²⁵

4.2.8. Ensaio cinético de acetilcolinesterase

Para a quantificação da atividade enzimática do enzima acetilcolinesterase utilizou-se um método adaptado do método descrito por Ingkanian *et al.* em 2003.^{33, 37} Como substratos para este ensaio usou-se iodeto de acetiltiocolina (AChI) e 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), sendo o AChI preparado em água destilada e o DTNB em tampão tris 50 mM a pH 8 com sais (0,1 M NaCl e 0,02 M MgCl₂). Juntou-se numa *cuvette* tampão tris 50 mM a pH 8, 100 µL com inibidor (extrato das diferentes plantas ou padrão) e 25 µL de enzima com a concentração de 5 U/mL e incubou-se durante 15 minutos. Após o tempo de incubação deu-se início à reação com a adição de 75 µL de AChI e 425 µL de DTNB, o esquema da reação encontra-se representado na **Figura 6**. A variação de absorvência foi medida as 405 nm.^{25, 30}

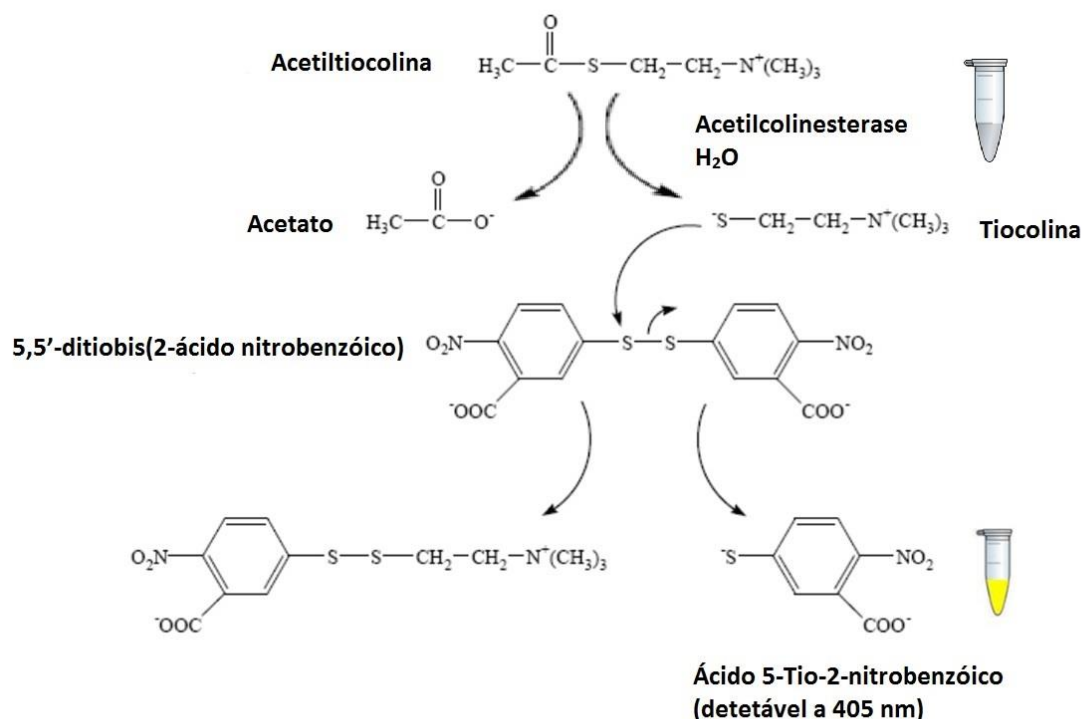


Figura 6. Esquema reacional da reação do enzima acetilcolinesterase. [adaptado de Frasco *et al.* (2005)]⁷⁴

O ensaio foi realizado em triplicado para várias concentrações de inibidor de modo a determinar o IC₅₀ para cada um, sendo os inibidores as decocções de plantas do género *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ernstii*, *P. gradidentatus*, *P. lanuginosus*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e “Ubombo”, *P. venterii* e *P. zuluensis*). O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer e os reagentes encontram-se na **Tabela 1**. A inibição enzimática foi calculada segundo a equação:

$$I(\%) = 100 - \left(\frac{A_{amostra}}{A_{controlo}} \right) \times 100 \quad [\text{Eq.4}]$$

Sendo *I* (%) a inibição expressa em percentagem, a *A*_{amostra} a absorvência do ensaio realizado com a amostra (inibidor) e *A*_{controlo} a absorvência do ensaio controlo.

4.2.9. Ensaio cinético de álcool desidrogenase

Para a realização do ensaio cinético do enzima ADH foi utilizou-se um método adaptado de *Tsigos et al.* (1998).³⁹ Colocou-se numa *cuvette* 100 µL de cloreto de cálcio 100 mM, 100 µL de inibidor (extrato das diferentes plantas ou padrões), 70 µL de NAD⁺ 5 mM e 50 µL de etanol absoluto e 110 µL de ADH a 41,5 U/mL e perfez-se para um volume total de 1 mL com tampão tris 50 mM a pH 8. Os inibidores utilizados foram o cloreto de cobre, um padrão de ácido rosmarínico, e as decocções de plantas do género *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ernstii*, *P. gradidentatus*, *P. lanuginosus*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e “Ubombo”, *P. venterii*, *P. zuluensis*) em diferentes concentrações de forma a determinar o IC₅₀ para cada inibidor. A reação inicia-se com a adição de enzima aos restantes reagentes, o aumento de absorvência foi medido a 340 nm, à temperatura ambiente. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A atividade enzimática foi medida em unidades de absorvência por minuto e o volume de enzima ajustado de modo a obter uma atividade de 0,15 UA/min. O ensaio controlo foi realizado com água. O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro JASCO V-560 UV-Vis e os reagentes encontram-se na **Tabela 1**. A inibição enzimática foi calculada segundo a equação [Eq. 4].

4.2.10. Capacidade antioxidante

Para determinar a capacidade antioxidante dos compostos existem vários métodos, um dos mais utilizados é o método do DPPH[•] criado por Tepe *et al.* (2005).⁷⁵ Este método consiste na reação dos compostos existentes em solução com o radical DPPH[•], a redução deste radical é seguida espectrofotometricamente (a 515-517 nm), consoante o aumento do radical reduzido em solução passa de uma cor púrpura para a cor amarela, baixando a absorção da solução, o esquema da reação encontra-se representado na **Figura 7**.^{30, 46, 47}

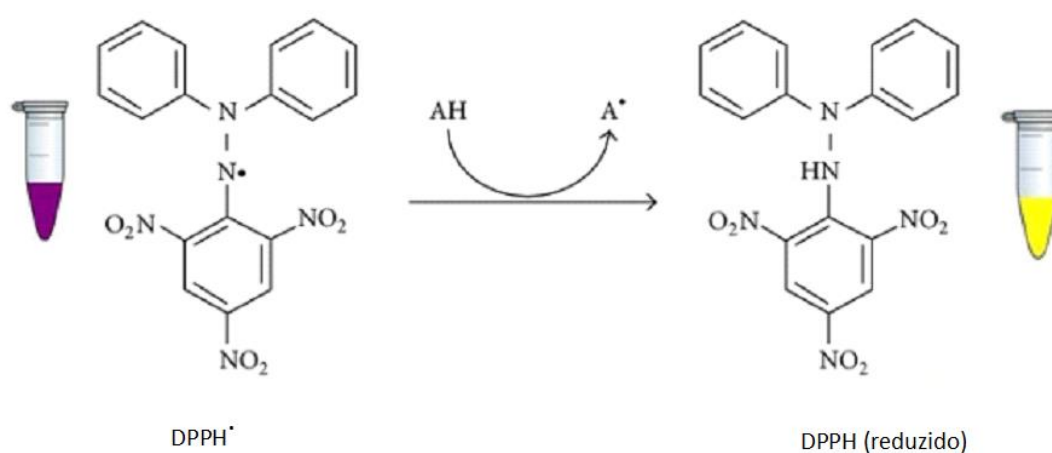


Figura 7. Esquema reacional da reação que ocorre no ensaio do DPPH[•]. [adaptado de Teixeira *et al.* (2013)]⁷⁶

Para determinar a capacidade antioxidante de cada extrato utilizou-se o método de Tepe *et al.* (2005) adaptado por Falé *et al.* (2009).^{47, 75} Para este método utilizou-se 1 mL de uma solução de 0,002 % de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) em metanol ao qual se adicionou 10 µL de solução do extrato das plantas (*P. barbatus*, *P. ernstii*, *P. gradidentatus*, *P. lanuginosus*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e “Ubombo”, *P. venter*, *P. zuluensis*). Como controlo para este ensaio foi utilizado o mesmo volume de água e adicionado a 1 mL de uma solução metanólica de 0,002 % de DPPH[•].⁴⁷ Todas as soluções foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. As absorvências foram lidas ao comprimento de onda de 517 nm e a amostra foi lida contra o respetivo branco.²⁵ O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer e os reagentes encontram-se na **Tabela 1**. O ensaio foi realizado em triplicado para várias concentrações de inibidor de modo a determinar o EC₅₀, a capacidade antioxidante foi calculada através da fórmula:

$$CA (\%) = 100 \times [(A_{DPPH} - A_{amostra})/A_{DPPH}] \quad [\text{Eq.5}]$$

Sendo **CA** (%) a capacidade antioxidante expressa em percentagem, a **A_{amostra}** a absorvência do ensaio realizado com a amostra (extrato) e **A_{DPPH}** a absorvência do ensaio controlo do DPPH' contra o branco.

4.2.11. Crescimento celular e manutenção das linhas celulares

Para realizar alguns ensaios com linhas celulares foi necessário levar a cabo um crescimento celular adequado. Foram utilizadas diferentes tipos de linhas celulares: HepG2 (ATCC®HB-8065) e MCF-7 (ATCC®HTB-22)). Para cada linha celular foi utilizado o meio de cultura adequado para a seu rápido crescimento e proliferação, sendo que para as linhas celulares HepG2 e MCF-7 utilizou-se meio de cultura DMEM. As linhas celulares foram mantidas constantemente numa estufa a 37 °C com uma atmosfera com 5 % de CO₂, numa estufa *Shel Lab CO₂ Series* da Sheldon Mfg.Inc®. Cada linha celular foi colocada a crescer no meio adequado em frascos T75 para crescimento celular, até se atingir a confluência desejada o meio de cultura foi trocado. Após as células atingirem 90 % de confluência procedeu-se à tripsinização das mesmas, para tal primeiramente lavou-se as células com 3 mL de PBS estéril (1:9 (v/v)), de seguida adicionou-se 1 mL de tripsina 1x e incubou-se a estufa durante 5 minutos. Após o término desse tempo procedeu-se à agitação vigorosa do frasco e à contagem celular utilizando um hemacitómetro e o reagente azul de tripano de forma a garantir o número de células correto para voltar a semear.^{34, 35, 77}

4.2.12. Citotoxicidade em diferentes linhas celulares

Muitos dos compostos existentes nas plantas possuem alguma toxicidade para o ser humano, sendo assim necessário testar a sua capacidade citotóxica. Para determinar a citotoxicidade dos extratos das diferentes espécies de *Plectranthus* (*P. barbatus*, *P. ernstii*, *P. gradidentatus*, *P. lanuginosus*, *P. madagascariensis*, *P. neochilus*, *P. verticillatus* “Barborton” e “Ubombo”, *P. venterii*, *P. zuluensis*) utilizou-se o método de viabilidade com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol) de Mosmann *et al.* (1983).⁷⁷ Este método consiste num ensaio colorimétrico onde é possível seguir a redução do MTT (que possui cor amarela)

devido à ação do enzima succinato desidrogenase mitocondrial, formando-se formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan). O formazan é um cristal insolúvel que se forma no interior das células, para ser possível a sua leitura no espectrofotómetro é necessário dissolver os cristais formados, para tal é utilizado DMSO ou metanol. É importante referir que apenas as células viáveis realizam a reação, sendo que a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis. O esquema da reação encontra-se apresentado na **Figura 8.**^{25, 34, 35, 77}

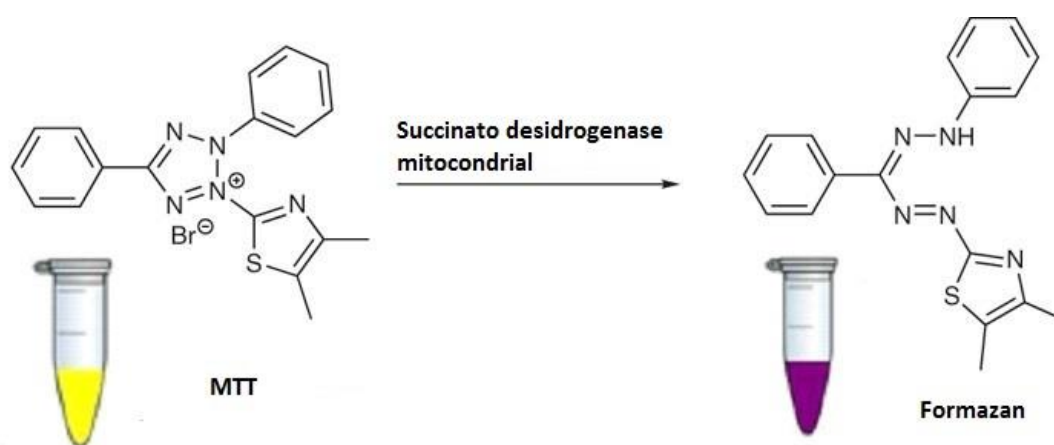


Figura 8. Esquema da reação que ocorre no ensaio do MTT. [adaptado de Ebada *et al.* (2008)]⁷⁸

As diferentes linhas celulares foram semeadas (100 μ L) em placas de 96 poços para crescimento celular numa concentração de 5×10^3 células/poço em meio DMEM. As placas foram incubadas na estufa anteriormente referida nas mesmas condições até atingirem a aderência e a confluência desejada para a realização do ensaio (90 %). Após atingirem esta confluência, cerca de 48 h de crescimento, o meio existente nos poços foi substituído por meio contendo concentrações crescentes de extrato, sendo que se manteve os poços referentes ao controlo em meio DMEM sem adição de qualquer tipo de extrato. Os extratos deixaram-se em contacto com as células durante 24 horas na estufa. Após o término das 24 horas, adicionou-se MTT dissolvido em meio DMEM numa concentração de 1 mg/mL e este esteve a incubar nas mesmas condições durante 4 horas. De seguida retirou-se a solução de MTT, adicionou-se 100 μ L de DMSO em cada poço e aguardou-se 1 hora. A absorvência da placa foi lida a 595 nm com referência a 630 nm num espectrofotómetro multicanal leitor de microplacas Tecan® Sunrise.^{25, 34, 35, 77} Os ensaios foram realizados em octuplicado. A absorvência foi comparada com a absorvência média dos poços de controlo. A concentração que provoca a diminuição de 50 % de

viabilidade celular (IC_{50}) foi determinado a partir de uma regressão linear. Assim a viabilidade celular é expressa pela equação:

$$VA (\%) = 100 \times (A_{amostra} / média de A_{controle}) \quad [Eq.6]$$

Sendo VA (%) a viabilidade celular expressa em percentagem, $A_{amostra}$ a absorvência da amostra e $A_{controle}$ a absorvência do controle.

4.2.13. Atividades biológicas das frações do *P. zuluensis*

O ensaio cinético de acetilcolinesterase das frações *P. zuluensis* foi realizado em triplicado como descrito em “4.2.8. Ensaio cinético de acetilcolinesterase”.

4.2.14. Ação de decocções sobre a estrutura da BSA e suas atividades biológicas

De modo a entender a influência que as decocções do género *Plectranthus* tinham na estrutura da BSA, realizaram-se os estudos de FT-IR descritos em “4.2.5. Análise da estrutura de proteínas por FT-IR” sendo que as mesmas amostras foram analisadas também por eletroforese como descrito em “4.2.6. Análise da estrutura de proteínas por eletroforese nativa”.

Para além destes ensaios realizaram-se também atividades biológicas destas amostras como descrito em “4.2.8. Ensaio cinético de acetilcolinesterase” e “4.2.10. Capacidade antioxidante”, estes últimos ensaios referidos foram realizados em duplicado.

4.2.15. Análise estatística

A análise estatística de todo o trabalho foi realizada no *software* Microsoft Office 2013® e no *software* GraphPad Prism 5®.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização das diferentes espécies de *Plectranthus* e estudo das suas atividades biológicas

5.1.1. Determinação da composição das decocções e concentração de ácido rosmarínico

Para a preparação de extratos utilizou-se por cada grama de planta 10 mL de água destilada, a decocção preparada foi seguidamente liofilizada, obtendo-se os rendimentos apresentados na

Tabela 5.

Tabela 5. Tabela de massas de planta, massa de extrato obtido e respetivos rendimentos.

<i>Plectranthus</i>	Peso folhas (g)	Peso extrato obtido (g)	Rendimento
<i>P. barbatus</i>	51,60	1,83	3,55 %
<i>P. ernstii</i>	47,64	0,90	1,87 %
<i>P. gradidentatus</i>	41,20	0,65	1,58 %
<i>P. lanuginosus</i>	38,70	0,83	2,14 %
<i>P. madagascariensis</i>	45,93	0,56	1,22 %
<i>P. neochillus</i>	46,26	1,12	2,42 %
<i>P. venterii</i>	19,55	0,43	2,20 %
<i>P. verticillatus</i> “Barborton”	60,00	0,66	1,11 %
<i>P. verticillatus</i> “Ubombo”	83,09	1,21	1,46 %
<i>P. zuluensis</i>	31,00	0,72	2,32 %

Posteriormente estes extratos foram analisados por HPLC-RP-DAD, os cromatogramas encontram-se apresentados na **Figura 9**.

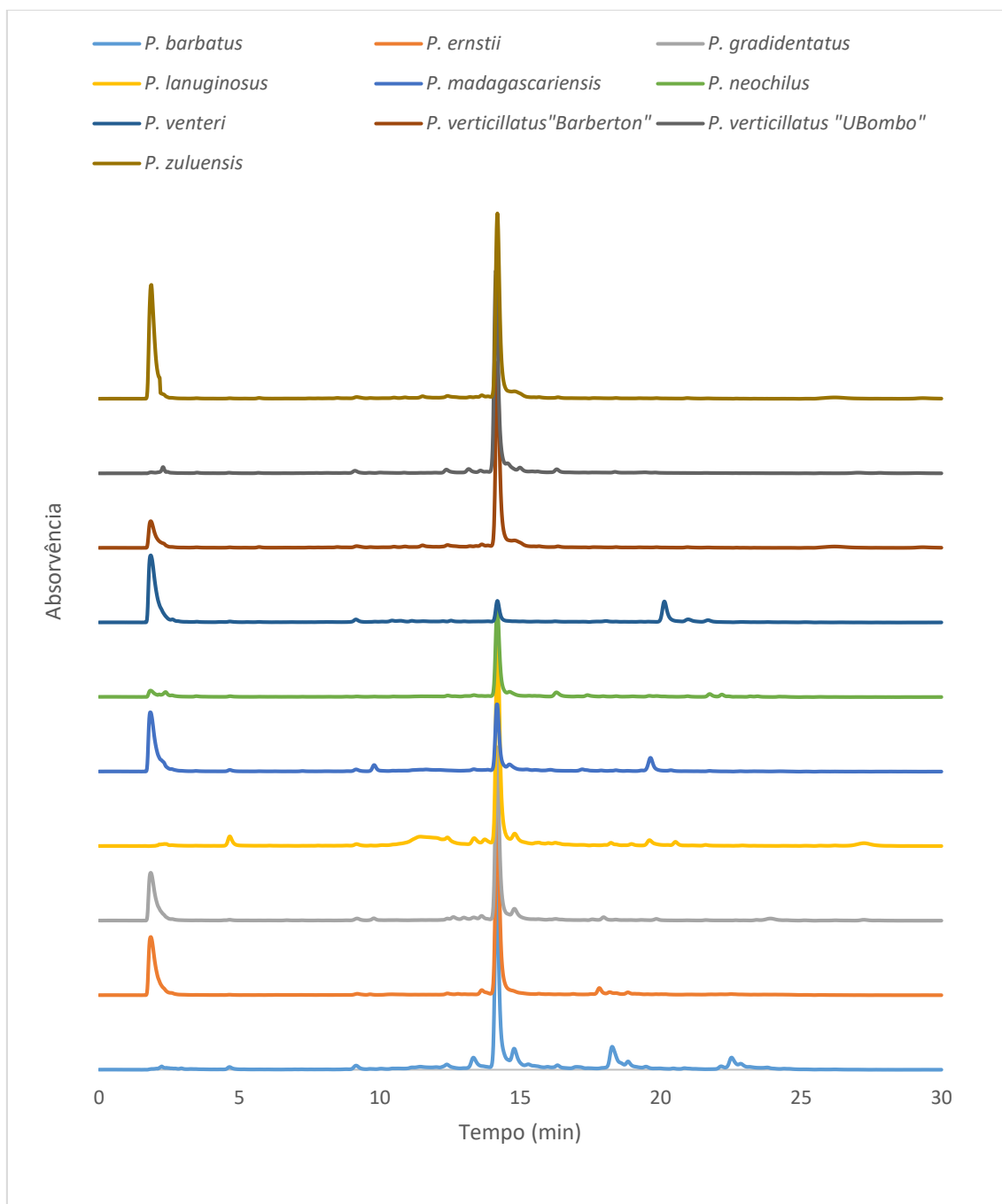


Figura 9. Cromatogramas dos extratos das diferentes espécies de *Plectranthus* usando a concentração de 1 mg/mL.

Nesta figura é notório que existe um componente maioritário em todos os extratos, segundo a literatura e dissertações realizadas anteriormente no grupo, este composto é o ácido rosmarínico.^{20, 27, 79-81} O ácido rosmarínico é um composto, característico do género Lamiaceae, derivado do ácido cafeico, como tal apresenta um espectro característico da família de compostos, que na gama dos 300 nm tem um pico que possui duas bandas. Este espectro pode ser confirmado na literatura, com os resultados do LC-MS e com comparação com o padrão.⁷⁹ O espectro do pico maioritário encontra-se na **Figura 10**, ocorrendo ao tempo de retenção de 14,11 minutos.

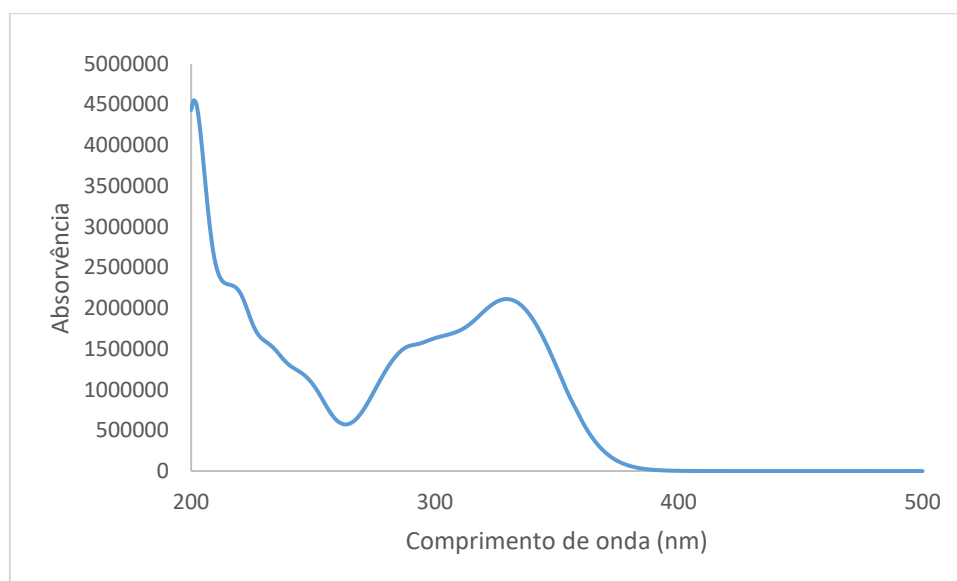


Figura 10. Espectro do ácido rosmarínico na decocção do *P. barbatus* (Tr=14,11 minutos).

Para determinar a concentração de ácido rosmarínico, uma vez que é o componente maioritário, em cada decocção elaborou-se uma reta de calibração com o padrão de ácido rosmarínico, sendo a reta obtida $y = 8 \times 10^6 x + 197222$ ($R^2 = 0,9862$). Para traçar esta reta utilizou-se a área de cada pico, sendo que à área total deste foi subtraído o valor de absorvência mínimo antes do início do pico. A concentração de ácido rosmarínico em cada decocção encontra-se enunciada na **Tabela 6**.

De entre as várias espécies de plantas estudadas, foi verificado que as que possuem maior concentração de ácido rosmarínico são o *P. lanuginosus* e o *P. zuluensis* (0,351 e 0,342 mg de AR/mg de extrato, respetivamente), sendo que, o que possui uma concentração menor de ácido rosmarínico é o *P. venter* (0,005 mg de AR/mg de extrato). Em termos de percentagens de ácido

rosmarínico, relativamente aos restantes compostos existentes em cada extrato, o que possui uma maior percentagem é o *P. verticillatus* “Barborton” e o que possui menor percentagem é o *P. venter*.

Nos cromatogramas obtidos, e como se pode verificar na **Tabela 6**, todos os extratos resultantes das decocções das plantas possuem outros compostos para além do ácido rosmarínico que podem ser mais ativos biologicamente que este, sendo que alguns destes compostos ainda não se encontram identificados.

Como tal, estes extratos podem ser divididos em três grupos, consoante a sua concentração em ácido rosmarínico: o grupo que possui uma grande concentração (0,280-0,351 mg/mg de extrato) do qual fazem parte o *P. ernstii*, o *P. lanuginosus*, o *P. verticillatus* cultivar “Barborton” e “Ubombo” e o *P. zuluensis*; o grupo com concentração intermédia de ácido rosmarínico (0,131-0,213 mg/mg de extrato) do qual fazem parte o *P. barbatus*, o *P. gradidentatus*, o *P. madagascariensis* e o *P. neochilus*; e o grupo que possui uma concentração menor (do qual faz parte apenas o extrato *P. venter*).

5.1.2. Composição dos extratos em taninos e fenóis totais

Para além da análise cromatográfica dos extratos preparados com base na decocção das diferentes plantas, foram quantificados os taninos totais existentes segundo “4.2.2. Quantificação de taninos” e os fenóis totais segundo o procedimento explicado em “4.2.3. Quantificação de fenóis totais”, os resultados encontram-se enunciados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Tabela com os resultados da quantificação de ácido rosmarínico, taninos e fenóis totais nas diferentes amostras, para cada quantificação encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não são significativamente diferentes.

Amostra	Concentração de AR (mg de AR/mg extrato)	Percentagem de ácido rosmarínico (%)	Taninos Totais (µg/mg de equivalentes de ácido tânico)	Fenóis Totais (µg/mg de equivalentes de ácido gálico)
<i>P. barbatus</i>	0,189	35,47	122,85 ± 4,18 ^A	109,00 ± 9,69 ^A
<i>P. ernstii</i>	0,287	93,57	205,70 ± 10,30 ^B	141,22 ± 22,02 ^{A,B}
<i>P. gradidentatus</i>	0,213	76,05	157,69 ± 1,51	113,81 ± 16,31 ^{A,B,C}
<i>P. lanuginosus</i>	0,351	22,87	222,07 ± 8,79 ^C	143,15 ± 35,59 ^{A,B,C,D}
<i>P. madagascariensis</i>	0,131	35,08	123,15 ± 1,48 ^{A,D}	90,48 ± 19,97 ^{A,B,C,D,E}
<i>P. neochilus</i>	0,169	77,66	73,09 ± 1,85 ^E	77,01 ± 13,36 ^{A,C,E,F}
<i>P. venter</i>	0,005	20,59	58,00 ± 1,31 ^E	57,05 ± 14,90 ^{A,C,E,F}
<i>P. verticillatus</i> "Barborton"	0,280	98,59	138,97 ± 4,92 ^{A,D}	122,70 ± 3,00 ^{A,B,C,D,E,F,G}
<i>P. verticillatus</i> "Ubombo"	0,282	86,82	197,07 ± 3,77 ^B	129,20 ± 7,23 ^{A,B,C,D,E,F,G,H}
<i>P. zuluensis</i>	0,342	97,71	225,45 ± 8,05 ^C	160,94 ± 32,32 ^{A,B,C,D,G,H}

Ao observar os resultados enunciados na **Tabela 6** verifica-se que existe uma relação com alguma proporcionalidade entre a concentração de ácido rosmarínico, a quantidade de taninos e fenóis totais existente em cada amostra (**Figura 11** e **Figura 12**), uma vez que os valores de R^2 são de 0,8092 e 0,9039, respetivamente. Esta proporcionalidade observada deve-se ao facto de ambos os métodos incluírem o ácido rosmarínico nos compostos que doseiam devido à sua estrutura química. Para além disso, estas correlações permitem uma comparação de quantidades de taninos e fenóis em função da quantidade de ácido rosmarínico que cada planta possui. Sendo que o extrato que possui maior valor de taninos totais é o *P. zuluensis* e o que possui menor é o *P. venter*. De acordo com a análise estatística realizada (*one-way ANOVA*) a concentração de ácido rosmarínico é estatisticamente significativa quando comparada com a concentração de taninos e fenóis totais, já os taninos e os fenóis totais não são significativamente diferentes. Relativamente à análise estatística entre cada categoria (concentração de ácido rosmarínico, concentração de fenóis e taninos totais) encontra-se apresentada na **Tabela 6**, sendo que os extratos que não apresentam uma significância estatística encontram-se identificados com letras iguais.

Na literatura é possível encontrar dados para algumas espécies de *Plectranthus*, mas não para todas as espécies testadas ao longo desta dissertação, sendo que os valores da literatura são muito semelhantes aos obtidos e apresentados na **Tabela 6** para os taninos.³ Outras referências

da bibliografia indicam que existem taninos nas amostras mas não quantificam, como é o caso de Assiimwe *et al.* em 2014 e Thangiah *et al.* em 2013.^{82, 83}

Relativamente aos fenóis totais, também são as amostras referenciadas anteriormente que possuem uma maior e menor quantificação, respetivamente. Comparando estes resultados com a literatura, verifica-se que os valores obtidos e apresentados na **Tabela 6** possuem algumas semelhanças, apesar de Bhatt *et al.* (2013) e Ramu *et al.* (2012) utilizarem extratos orgânicos.^{84,}

⁸⁵ As diferenças verificadas também podem dever-se ao facto de as plantas estarem em ciclos de vida diferentes e de estarem sujeitas a diferentes estímulos de *stress* ambiental produzindo assim diferentes compostos e diferentes quantidades dos mesmo compostos.

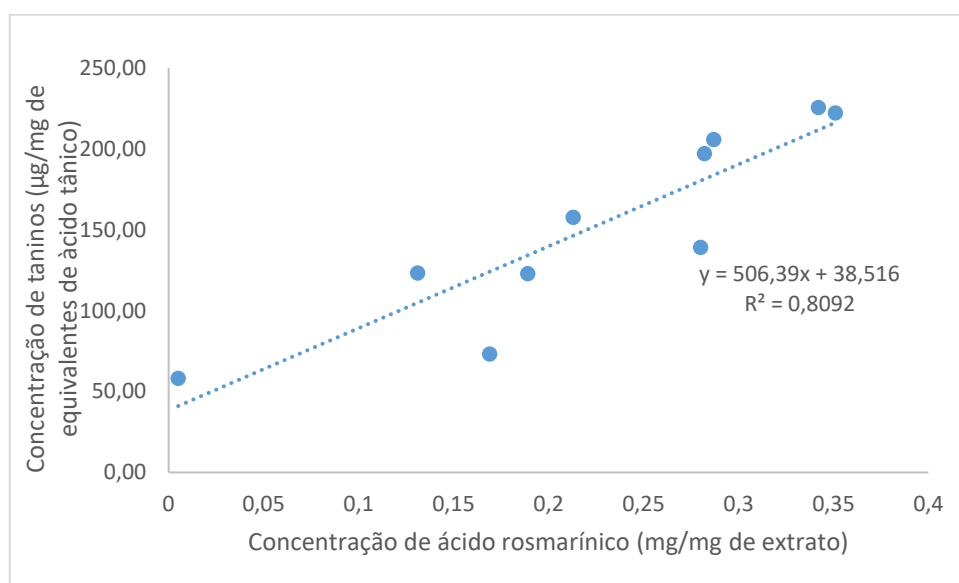


Figura 11. Gráfico da correlação entre a quantificação de taninos totais em função da concentração de ácido rosmarínico para os diferentes extratos.

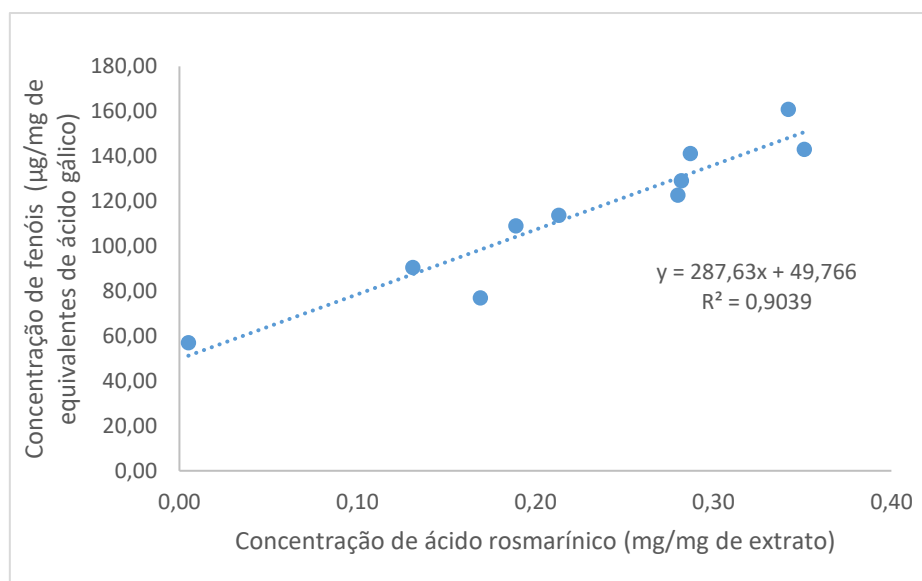


Figura 12. Gráfico da correlação entre a quantificação de fenóis totais em função da concentração de ácido rosmarínico para os diferentes extratos.

Apesar das correlações obtidas serem significativas a nível estatístico, o extrato do *P. venterii* é muito pobre em todos os compostos quantificados como se pode verificar na **Figura 13**. A semelhança de resultados relativamente à quantificação de taninos e fenóis totais pode dever-se às reações existentes no método de doseamento e ao local onde os reagentes reagem com os compostos existentes nas decocções.

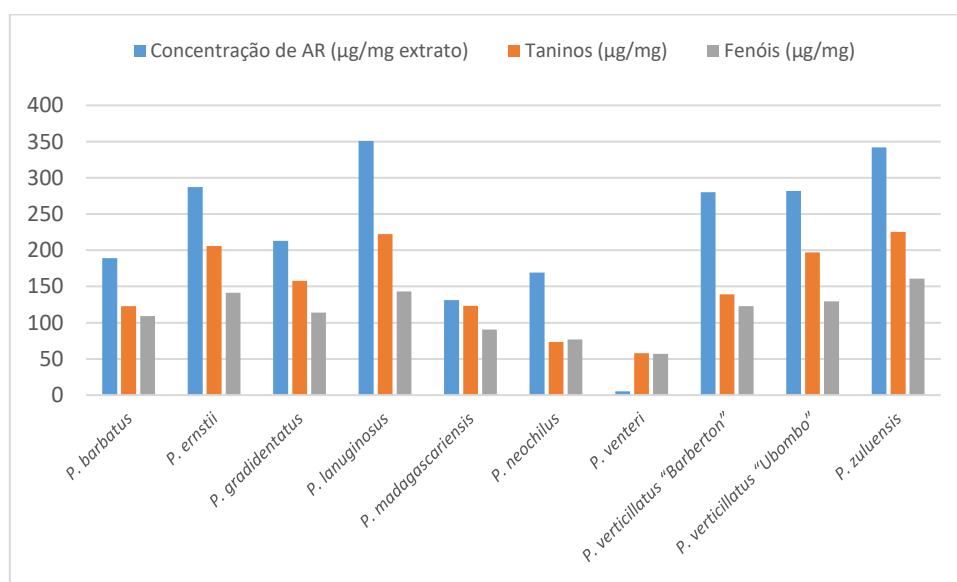


Figura 13. Gráfico com a quantificação de ácido rosmarínico, taninos e fenóis totais nos diferentes extratos.

5.1.3. Atividade antioxidante

Para o doseamento da atividade antioxidante utilizou-se o método descrito em “4.2.10. Capacidade antioxidante” sendo que os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 7**. Nesta tabela é notório que a amostra de *Plectranthus* com maior capacidade antioxidante é o extrato do *P. zuluensis* ($EC_{50}=13,31 \pm 1,43 \mu\text{g/mL}$) e com menor capacidade antioxidante é o *P. venter* ($EC_{50}=131,05 \pm 13,40 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 7. Valores de EC_{50} para o ensaio do DPPH^{*}, na tabela encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não apresentam significância estatística.

Amostra	Concentração de AR (mg de AR/mg de extrato)	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido rosmarínico	-	$2,83 \pm 0,05^A$
BHT	-	$11,44 \pm 3,23^{A,B}$
<i>P. barbatus</i>	0,189	$37,10 \pm 0,78^C$
<i>P. ernstii</i>	0,287	$20,14 \pm 0,57^{B,D}$
<i>P. gradidentatus</i>	0,213	$19,10 \pm 1,10^{B,D,E}$
<i>P. lanuginosus</i>	0,351	$17,58 \pm 1,95^{B,D,E,F}$
<i>P. madagascariensis</i>	0,131	$45,40 \pm 2,15^{C,G}$
<i>P. neochilus</i>	0,169	$50,22 \pm 8,31^{C,G}$
<i>P. venter</i>	0,005	$131,05 \pm 13,40$
<i>P. verticillatus</i> “Barborton”	0,280	$15,10 \pm 1,61^{A,B,D,E,F,H}$
<i>P. verticillatus</i> “Ubombo”	0,282	$18,13 \pm 0,80^{B,D,E,F,H,I}$
<i>P. zuluensis</i>	0,342	$13,31 \pm 1,43^{A,B,D,E,F,I}$

Na **Tabela 7** são apresentados também os valores de EC_{50} do ácido rosmarínico (o composto padrão de todos os extratos) e do valor do BHT. O BHT é um composto antioxidante padrão utilizado também na indústria alimentar e dermocosmética.⁸⁶ O ácido rosmarínico de todos os compostos testados é o que possui maior capacidade antioxidante, possuindo um EC_{50} de $2,83 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, já o BHT possui um EC_{50} de $11,44 \pm 3,23 \mu\text{g/mL}$. Comparando os valores obtidos para o ácido rosmarínico e para o BHT, estes encontram-se dentro dos valores reportados na bibliografia.^{30, 33}

A capacidade antioxidante de cada extrato varia consoante a sua composição, assim foi possível traçar correlações entre os valores de EC_{50} obtidos para o ensaio do DPPH em função das concentrações de ácido rosmarínico, taninos e fenóis totais (**Figura 14**, **Figura 15** e **Figura 16**, respetivamente). Nestas correlações observa-se que existe uma diferença entre os componentes da decocção e a capacidade antioxidante, sendo que a melhor correlação obtida foi a da concentração de ácido rosmarínico com o valor de EC_{50} ($R^2=0,802$). Já as correlações existentes entre o valor de EC_{50} e a concentração de taninos totais e a concentração de fenóis totais não são estatisticamente muito significativas uma vez que possuem R^2 de 0,5939 e 0,7029, respetivamente.

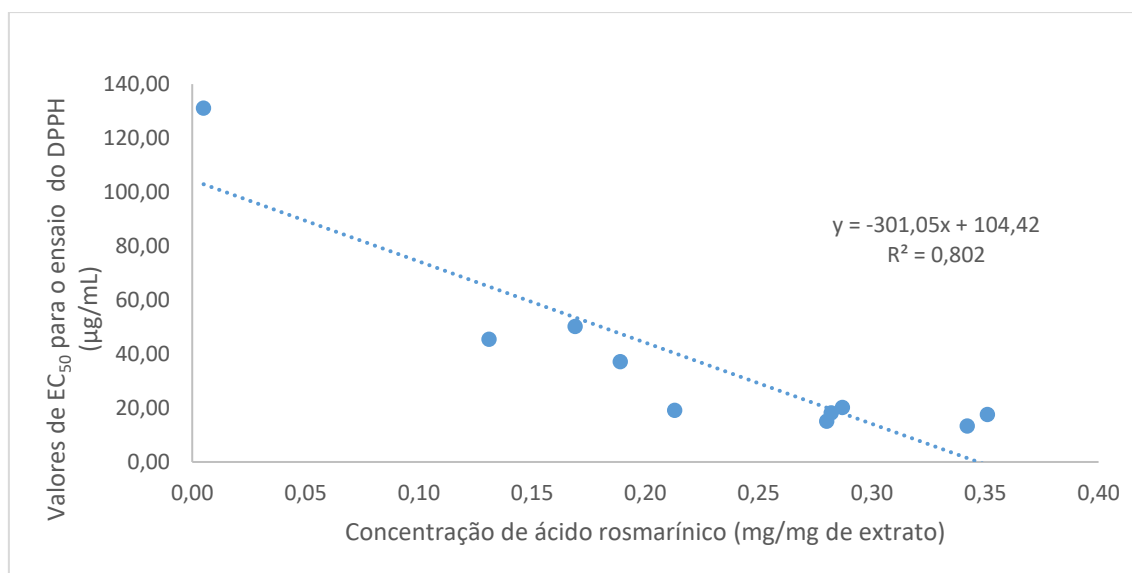


Figura 14. Gráfico da correlação entre os valores de EC_{50} e a concentração de ácido rosmarínico existente entre cada extrato.

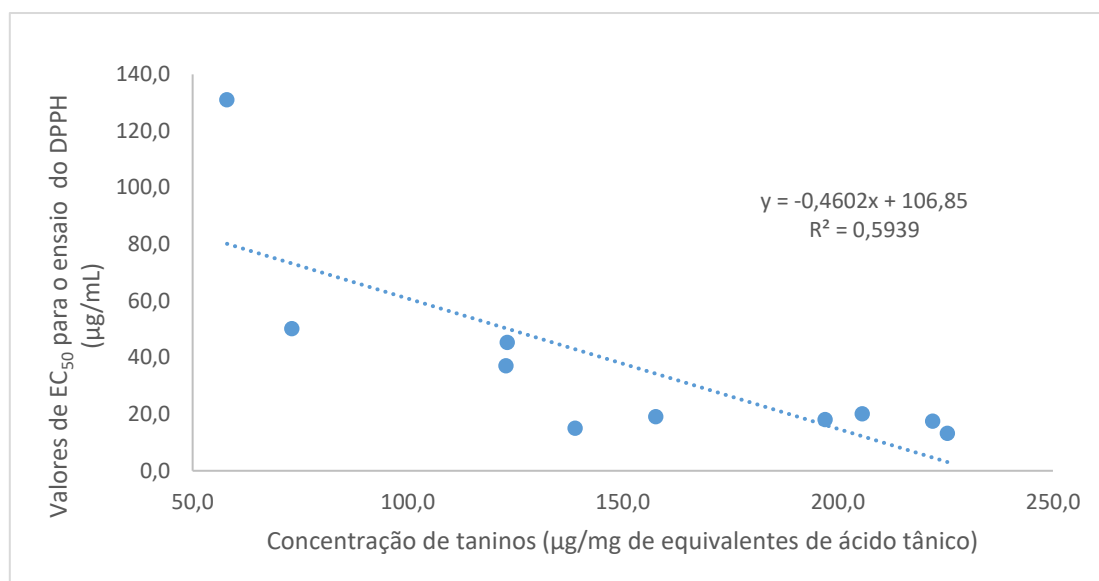


Figura 15. Gráfico da correlação entre os valores de EC₅₀ e a concentração de taninos totais existente entre cada extrato.

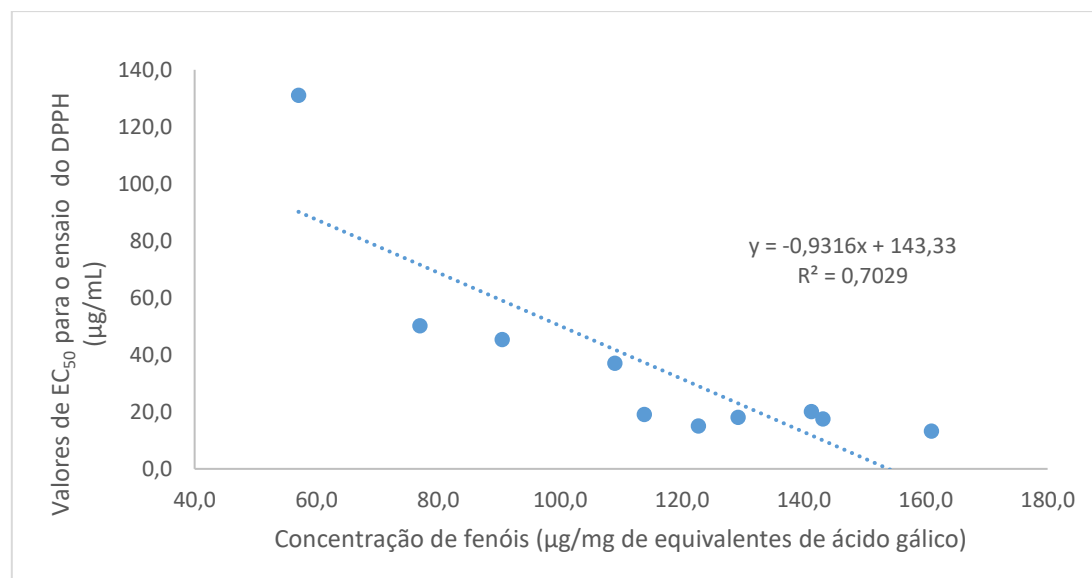


Figura 16. Gráfico da correlação entre os valores de EC₅₀ e a concentração de fenóis totais existente entre cada extrato.

Assim é possível verificar que a diminuição de concentração de ácido rosmarínico e de fenóis totais causam uma diminuição da capacidade antioxidante do extrato. Sendo que o valor de EC₅₀ do *P. zuluensis*, *P. verticillatus* "Barborton" e *P. lanuginosus* é muito semelhante ao valor de EC₅₀ do BHT.³⁰

A melhor correlação obtida foi a correlação com a concentração de ácido rosmarínico, o que já seria previsível segundo o valor de EC_{50} do ácido rosmarínico, uma vez que foi o menor valor obtido.

5.1.4. Ensaio cinético de inibição do enzima acetilcolinesterase

A inibição do enzima acetilcolinesterase pode ter efeitos tanto ao nível da doença de Alzheimer como ao nível da digestão uma vez que existem recetores de acetilcolina por todo o sistema nervoso, incluindo o sistema nervoso periférico que controla o sistema digestivo. Com a inibição do enzima acetilcolinesterase a acetilcolina não é degradada e encontra-se assim mais tempo na fenda sináptica potenciando a passagem de impulso nervoso, e aumentando consequentemente a resposta.^{28, 31}

Para cada extrato foi determinado o IC_{50} para este enzima, com recurso a um ensaio cinético, sendo que os resultados encontram-se enunciados na **Tabela 8**.³³

Tabela 8. Tabela com os valores de IC_{50} para cada extrato, na tabela encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não apresentam significância estatística.

Amostra	Concentração de AR (mg/mg de extrato)	IC_{50} (mg/mL)	Concentração de AR no IC_{50} (mg/mL)	Percentagem do AR no IC_{50} (%)	Percentagem do IC_{50} justificado pelo AR (%)
Ácido rosmarínico	-	$0,10 \pm 0,03^A$	-	-	-
<i>P. barbatus</i>	0,189	$0,41 \pm 0,12^B$	0,077	39,80	79,61
<i>P. ernstii</i>	0,287	$0,39 \pm 0,03^{B,C}$	0,112	58,02	100,00
<i>P. gradidentatus</i>	0,213	$0,23 \pm 0,11^{A,B,C,D}$	0,049	25,39	50,79
<i>P. lanuginosus</i>	0,351	$0,21 \pm 0,03^{A,B,C,D,E}$	0,074	38,21	76,42
<i>P. madagascariensis</i>	0,131	$0,44 \pm 0,18^{B,C,D,E,F}$	0,058	29,88	59,76
<i>P. neochilus</i>	0,169	$0,43 \pm 0,05^{B,C,D,E,F,G}$	0,073	37,67	75,34
<i>P. venterii</i>	0,005	$1,03 \pm 0,19^I$	0,005	2,67	5,34
<i>P. verticillatus</i> "Barborton"	0,280	$0,12 \pm 0,03^{A,C,D,E,H}$	0,034	17,42	34,83
<i>P. verticillatus</i> "Ubombo"	0,282	$0,55 \pm 0,02^{B,C,F,G}$	0,155	80,40	100,00
<i>P. zuluensis</i>	0,342	$0,08 \pm 0,05^{A,D,E,H}$	0,027	14,18	28,36

Como podemos observar na **Tabela 8**, o extrato que possui o maior valor de IC₅₀ é o *P. venter* (1,03 ± 0,19 mg/mL), enquanto que o que possui menor valor é o extrato do *P. zuluensis* (0,08 ± 0,05 mg/mL). O ensaio foi também realizado para um padrão de ácido rosmarínico, para o qual se obteve um valor de IC₅₀ de 0,10 ± 0,03 mg/mL.

Kubínová *et al.* testou também o efeito inibidor do ácido rosmarínico, em solução metanólica, no enzima AChE, obtendo um valor de IC₅₀ de 527,8 µM.²⁷ Convertendo o valor de IC₅₀ obtido na atividade experimental de modo a comparar com a literatura, obtém-se 277,5 µM. O valor obtido cerca de metade do obtido por Kubínová *et al.* isto pode dever-se à diferença de preparação de amostras, uma vez que as amostras preparadas ao longo dos trabalhos experimentais que resultaram nesta dissertação são aquosas e as referidas no artigo científico de Kubínová são metanólicas. Já Falé *et al.* em 2009 testou o *P. barbatus* para este ensaio e obteve um IC₅₀ de 0,40 mg/mL, sendo que o valor obtido nos trabalhos experimentais desta dissertação encontra-se em concordância, uma vez que o valor obtido foi de 0,41 mg/mL.^{33, 36}

Para melhor compreender qual a percentagem de atividade que era justificada pela presença do ácido rosmarínico, calculou-se primeiramente a concentração de ácido rosmarínico, e a sua respetiva percentagem, que efetivamente existia no valor de IC₅₀ em cada extrato. Como é possível observar na **Tabela 8**, verifica-se que para o *P. ernstii* e o *P. verticillatus* “Ubombo” a concentração de ácido rosmarínico existente no extrato justifica na totalidade a capacidade inibitória do extrato. No entanto, para a amostra *P. zuluensis* a quantidade de ácido rosmarínico existente no extrato justifica apenas 28 % da atividade inibitória, assim é possível afirmar que existem outros compostos no extrato que também apresentam atividade inibitória da acetilcolinesterase. Já para o extrato de *P. venter* o ácido rosmarínico justifica apenas 5,34 % da sua atividade anti-acetilcolinesterase.

Na **Figura 17** encontra-se representada a correlação entre a concentração de ácido rosmarínico e o valor de IC₅₀ de cada extrato, sendo possível observar que a concentração de ácido rosmarínico com os valores de IC₅₀ para o ensaio de acetilcolinesterase apresenta correlação com um R²=0,6586. Esta correlação não apresenta um valor de R² muito elevado, o que sugere que a atividade inibidora da decocção não depende inteiramente do ácido rosmarínico, mas sim do conjunto de compostos existentes na decocção.

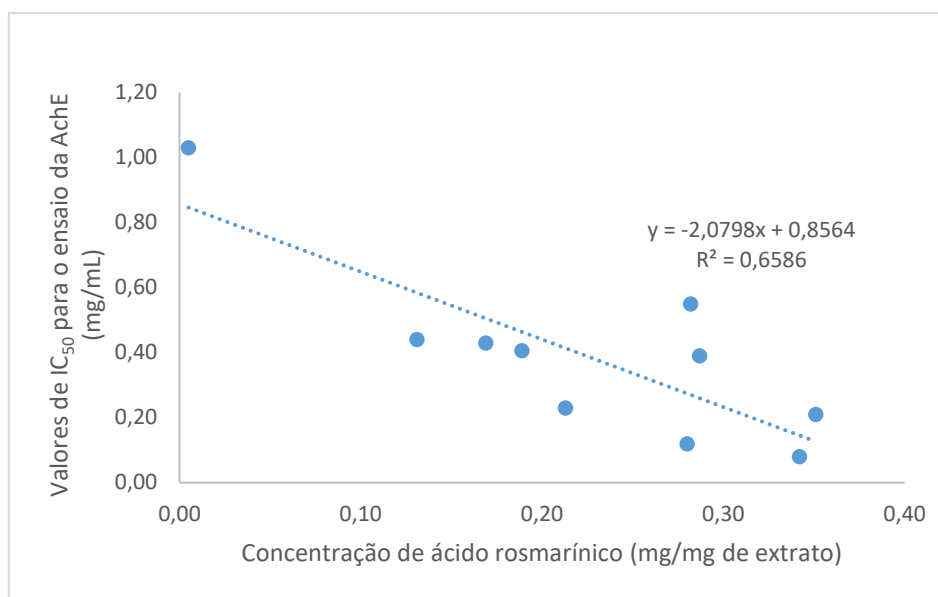


Figura 17. Gráfico de correlação da concentração de ácido rosmarínico com os valores de IC_{50} para o ensaio cinético de acetilcolinesterase.

De modo a tentar perceber se existiria alguma relação entre os valores de IC_{50} e a composição em taninos e fenóis dos extratos, traçou-se também as correlações entre este, sendo apresentadas nas **Figura 18** e **Figura 19**, respetivamente.

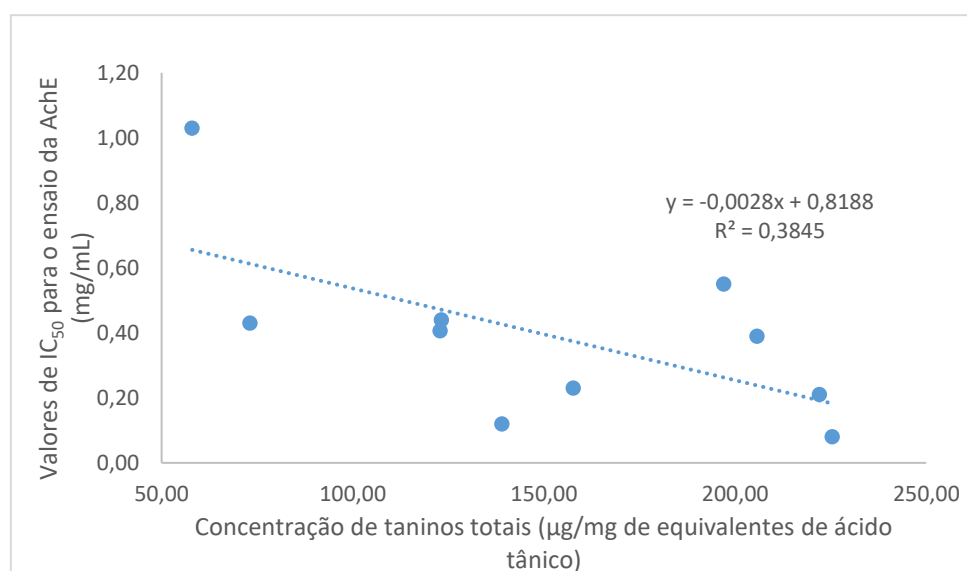


Figura 18. Gráfico da correlação do IC_{50} para AChE com concentração de taninos totais.

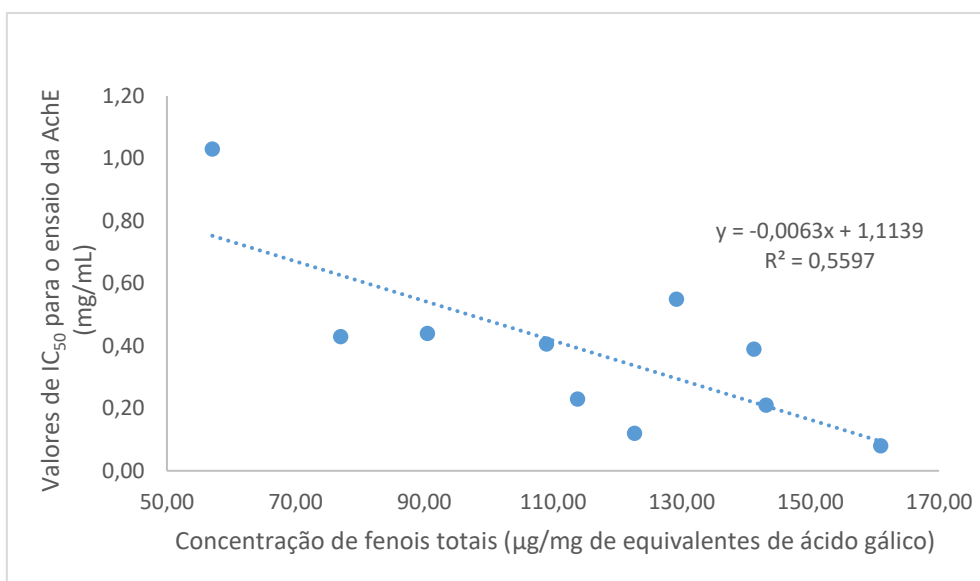


Figura 19. Gráfico da correlação do IC₅₀ para AChE com concentração de fenóis totais.

Observando a **Figura 18** e a **Figura 19** verifica-se que as correlações obtidas com a concentração de taninos e fenóis totais de cada extrato não apresentam significância estatística uma vez que as retas obtidas possuem um $R^2=0,3845$ para a correlação com os taninos e um $R^2=0,5597$ para os fenóis totais, a presença destes compostos não determina a capacidade inibitória para este enzima uma vez que a estrutura química dos compostos é que determina a atividade anti-acetilcolinesterase. A melhor correlação obtida foi a estabelecida com a concentração de ácido rosmarínico, esta correlação faz sentido uma vez que este composto apresenta uma elevada capacidade inibitória para a acetilcolinesterase. Esta correlação encontra-se de acordo com o referenciado na bibliográfica, uma vez que estudos de *docking* mostraram que o ácido rosmarínico conseguia encaixar no centro ativo do enzima e inibir o enzima.^{87, 88} Por outro lado, os taninos geralmente são moléculas de grandes dimensões (500-5000 Da) o que impossibilita a entrada no centro ativo do enzima (20 Å).^{21-23, 88} Já na quantificação dos fenóis encontram-se englobadas muitas moléculas de estruturas químicas muito diferentes, o que não permite estabelecer uma relação com a capacidade inibitória.

Com base nestes resultados é possível concluir que as atividades inibitórias devem-se em grande parte ao ácido rosmarínico, contudo a atuação conjunta dos componentes do extrato é mais eficiente na inibição. Assim, é possível verificar que consoante existe um decréscimo de ácido rosmarínico menor é o efeito inibitório, e que quanto menor é o valor de IC₅₀, maior é a quantidade de fenóis e taninos totais existente no extrato. Contudo existem extratos que possuem uma concentração de ácido rosmarínico semelhante, o *P. zuluensis* e o *P. lanuginosus*

(0,342 e 0,351 mg de AR/mg de extrato, respetivamente) e apresentam atividades bastantes distintas (0,08 e 0,21 mg/mL, respetivamente), este facto pode dever-se a compostos que o extrato do *P. zuluensis* possua diferentes dos compostos que existem nos outros extratos.

5.1.5. Ensaio cinético de álcool desidrogenase

A inibição deste enzima é um dos métodos para evitar a ressaca, sendo que já existem fármacos no mercado para esse efeito.^{89, 90} O álcool desidrogenase possui um átomo de zinco que é crucial para a sua atividade, quelantes de metais ou outros compostos que bloqueiem o acesso do substrato ao átomo de zinco são inibidores deste enzima.⁴⁵

Para cada extrato foi determinado o IC₅₀ para este enzima, sendo que os resultados encontram-se enunciados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Tabela de valores de IC₅₀ para o enzima álcool desidrogenase, na tabela encontram-se identificadas com letras iguais as amostras que não apresentam significância estatística.

Amostra	Concentração de AR (mg/mg de extrato)	IC ₅₀ (µg/mL)	Concentração de AR no IC ₅₀ (mg/mL)	Percentagem do AR no IC ₅₀ (%)	Percentagem do IC ₅₀ justificado pelo AR (%)
Ácido rosmarínico	-	19 ± 4 ^A	-	-	-
Cloreto de Cobre (CuCl ₂)	-	3 ± 0 ^{A,B}	-	-	-
<i>P. barbatus</i>	0,189	28 ± 3 ^{A,B,C}	0,005	13,99	27,99
<i>P. ernstii</i>	0,287	47 ± 10 ^{A,C,D}	0,014	35,70	71,40
<i>P. gradidentatus</i>	0,213	37 ± 2 ^{A,B,C,D,E}	0,008	20,80	41,60
<i>P. lanuginosus</i>	0,351	30 ± 4 ^{A,B,C,D,E,F}	0,011	28,05	56,10
<i>P. madagascariensis</i>	0,131	67 ± 23 ^{D,E,G}	0,009	23,23	46,46
<i>P. neochilus</i>	0,169	95 ± 8 ^{G,H}	0,016	42,35	84,70
<i>P. venterii</i>	0,005	104 ± 33 ^{G,H}	0,001	1,37	2,74
<i>P. verticillatus</i> "Barborton"	0,280	32 ± 8 ^{A,B,C,D,E,F,G,I}	0,009	23,83	47,66
<i>P. verticillatus</i> "Ubombo"	0,282	25 ± 6 ^{A,B,C,D,E,F,I,J}	0,007	18,72	37,45
<i>P. zuluensis</i>	0,342	42 ± 3 ^{A,C,D,E,F,G,I,J}	0,014	38,03	76,06

Como inibidor padrão para o álcool desidrogenase utilizou-se o cloreto de cobre, este possui um IC₅₀ de 3 ± 0 µg/mL (176 µM), para além deste testou-se também o ácido rosmarínico que possui um valor de IC₅₀ 19 ± 4 µg/mL (527 µM), sendo que o cloreto de cobre é o inibidor mais potente

de todos os testados. Comparando a capacidade inibitória do ácido rosmarínico com os inibidores testados por Tsigos *et al.* verifica-se que o ácido rosmarínico apresenta uma capacidade de inibir o enzima álcool desidrogenase muito superior ao cloreto de sódio, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio ou ainda do que ao EDTA, sendo assim possível afirmar que o ácido rosmarínico é um bom inibidor.³⁹

Dos extratos analisados o que possui um maior valor de IC_{50} é o *P. venter* ($104 \pm 33 \mu\text{g/mL}$) e o menor valor é o *P. verticillatus* cultivar “Ubombo” ($25 \pm 6 \mu\text{g/mL}$). Para perceber qual a percentagem de atividade que era justificada pelo ácido rosmarínico, primeiramente calculou-se a concentração de ácido rosmarínico que existia no valor de IC_{50} em cada extrato e a sua respetiva percentagem. Observando a percentagem de ácido rosmarínico que justificam a atividade verifica-se que variam entre 2,74 % (*P. venter*) e 84,70 % (*P. neochilus*), sendo as mais elevadas a percentagem do *P. neochilus* e do *P. zuluensis* (76,06 %). De modo a tentar perceber se existia ou não uma dependência entre a atividade e os compostos existentes nas decocções, traçou-se uma correlação com as atividades de cada extrato e as respetivas concentrações de ácido rosmarínico, obtendo-se um $R^2 = 0,5996$ (Figura 20).

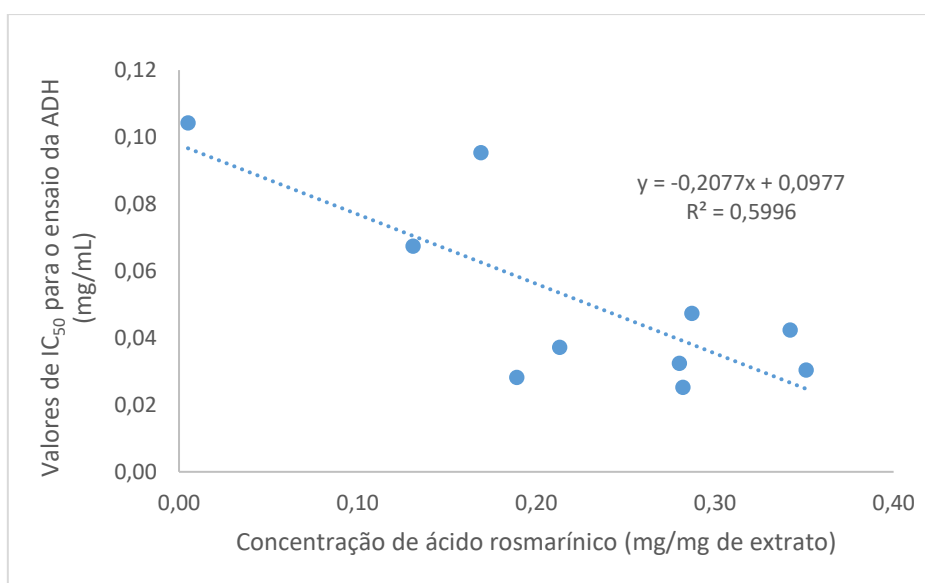


Figura 20. Gráfico de correlação entre IC_{50} para o álcool desidrogenase e a concentração de ácido rosmarínico.

De acordo com o R^2 desta correlação (**Figura 20**) é possível afirmar que a inibição do enzima álcool desidrogenase não é só dependente do ácido rosmarínico, apesar de este ser um bom inibidor, mas também de outros compostos presentes na amostra. De forma a tentar estabelecer uma relação entre a atividade inibitória e a existência de compostos na decocção, estabeleceu-se a correlação entre a atividade inibitória e a concentração de taninos (**Figura 21**) e a concentração de fenóis (**Figura 22**).

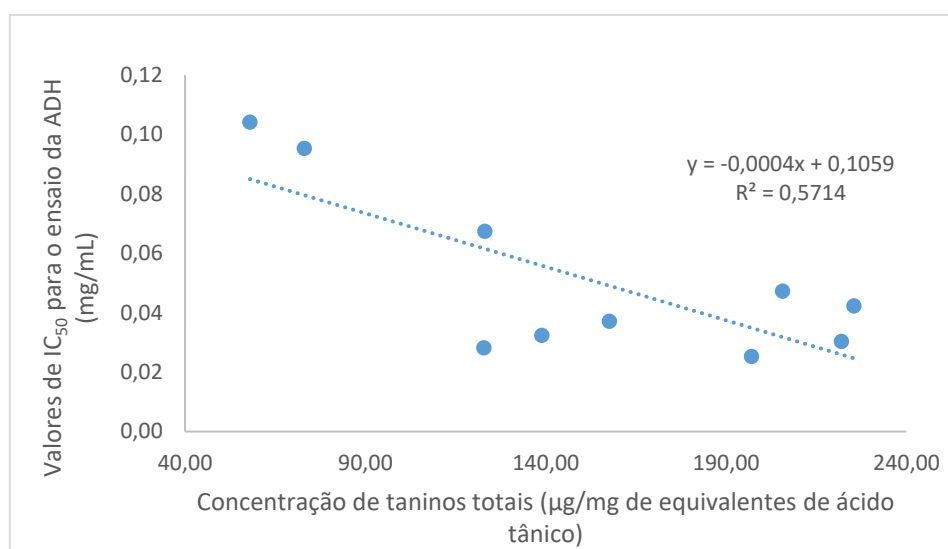


Figura 21. Gráfico de correlação entre IC_{50} para o álcool desidrogenase e a concentração de taninos totais.

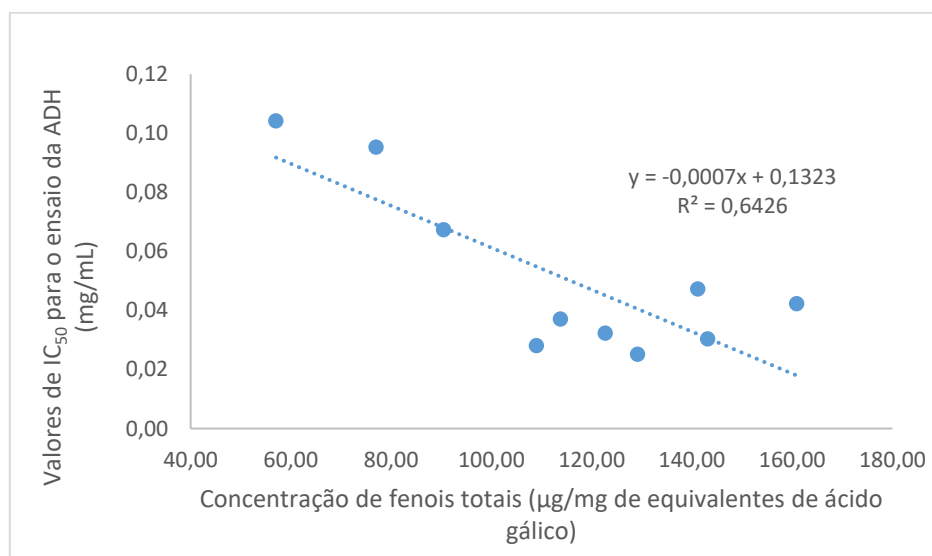


Figura 22. Gráfico de correlação entre IC_{50} para o álcool desidrogenase e a concentração de fenóis totais.

Observando a **Figura 21** e a **Figura 22** verifica-se que os valores de R^2 não são muito superiores do que o valor obtido para a correlação com o ácido rosmarínico, sendo que estes de apresentam um valor de R^2 de 0,5714 para a correlação com os taninos e de 0,6426 para a correlação com os fenóis totais. Assim não foi possível estabelecer uma relação entre o valor de IC_{50} obtido e os compostos existentes nas decocções, sendo que a correlação que apresentou significância estatística a traçada com a concentração de fenóis. Consequentemente pode dizer-se que a mistura de fenóis, ou seja a decocção, é o mais eficaz para inibir o enzima.

Na bibliografia existem vários relatos que os polifenóis possuem uma capacidade inibitória deste enzima, contudo não foi possível comparar os valores da bibliografia com os valores obtidos, uma vez que os relatos da bibliografia tratam-se de compostos puros ao contrário dos testados ao longo do trabalho prático desta dissertação. Apesar de se ter obtido valores de inibição do álcool desidrogenase para o caso do extrato do *P. verticillatus* “Ubombo” e *P. barbatus* nem todos os extratos podem ser utilizados para consumo doméstico, no caso do *P. verticillatus* “Ubombo” esta planta só é indicada como ornamental. Já o *P. barbatus* é utilizado no Brasil para o tratamento da ressaca,⁹¹ o que está de acordo com os nossos resultados uma vez que apresenta um valor baixo de IC_{50} para o ADH ($28 \pm 3 \mu\text{g/mL}$). Assim é possível afirmar que o *P. verticillatus* “Ubombo” também seria um bom recurso no tratamento da ressaca, contudo o seu uso apenas ornamental dificulta o recurso a esta planta, assim a possível identificação, extração e isolamento do composto inibidor seria interessante a nível farmacológico.

5.1.6. Simulação do metabolismo das decocções *in vitro* por ação de suco gástrico e suco pancreático

De forma a perceber se as atividades previstas *in vitro* se poderiam verificar *in vivo* procedeu-se à digestão gástrica e pancreática das decocções como descrito em “4.2.7. Simulação do metabolismo das decocções *in vitro* por ação de suco gástrico e suco pancreático”, sendo os resultados apresentados **Tabela 10**. Estas amostras não sofreram qualquer alteração no seu perfil cromatográfico, consequentemente pode-se afirmar que nem a digestão gástrica nem a digestão pancreática metaboliza os compostos das decocções testadas. Contudo na literatura existem resultados contraditórios, em 2010 Porfírio *et al.* realizaram a digestão do *P. barbatus* e observaram alterações no perfil cromatográfico antes e após a simulação da digestão.³⁶ As diferenças obtidas devem-se possivelmente ao facto de serem extratos diferentes, apesar de

serem recolhidos da mesma fonte biológica, e da sua diferente composição fitoquímica. Esta diferença na composição química de cada extrato depende da altura do ano em que o material biológico foi recolhido e dos diferentes estímulos ambientais a que as plantas estão sujeitas.

Tabela 10. Tabela com os resultados das digestões gástrica e pancreática.

Amostra	Alteração na Digestão Gástrica	Alterações na Digestão Pancreática
<i>P. barbatus</i>	Não	Não
<i>P. ernstii</i>	Não	Não
<i>P. gradidentatus</i>	Não	Não
<i>P. lanuginosus</i>	Não	Não
<i>P. madagascariensis</i>	Não	Não
<i>P. neochilus</i>	Não	Não
<i>P. venterii</i>	Não	Não
<i>P. verticillatus</i> "Barberton"	Não	Não
<i>P. verticillatus</i> "Ubombo"	Não	Não
<i>P. zuluensis</i>	Não	Não

5.1.7. Isolamento de frações da amostra de *P. zuluensis* e suas atividades biológicas

De forma a tentar perceber qual dos compostos seria mais ativo no *P. zuluensis* de modo a justificar o seu valor de IC_{50} para o ensaio da acetilcolinesterase, primeiramente procedeu-se à análise cromatográfica deste extrato com dois métodos cromatográficos diferentes: um usado o eluente metanol: ácido fórmico (de acordo com a **Tabela 3**) sendo o seu cromatograma apresentado na **Figura 23** e um eluente usando metanol: ácido trifluoroacético (de acordo com a **Tabela 4**) sendo o seu cromatograma apresentado na **Figura 24**. Na **Tabela 11** encontra-se referenciado a nomenclatura das frações e os respetivos métodos utilizados na recolha e tempos de recolha, evaporação e análise, já na **Tabela 12** encontram-se todas as massas das frações recolhidas (exceto a fração que não sofreu evaporação).

Tabela 11. Tabela com a nomenclatura das frações.

Método de recolha cromatográfica (eluente utilizado)	Tempos de recolha (min)	Método de evaporação	Método de análise cromatográfica (eluente utilizado)	Nome da fração	
Metanol: ácido fórmico	0-30	Evaporador rotativo	Metanol: ácido fórmico	1F-R-F	
	30-32			2F-R-F	
	32-90			3F-R-F	
	0-30		Metanol: ácido trifluoroacético	1F-R-A	
	30-32			2F-R-A	
	32-90			3F-R-A	
Metanol: ácido trifluoroacético	0-13			1A-R-A	
	13-16			2A-R-A	
	16-30			3A-R-A	
	0-13	Liofilizador		1A-L-A	
	13-16			2A-L-A	
	16-30			3A-E-A	
	0-13	Não sofreu evaporação		1A-N-A	
	13-16			2A-N-A	
	16-30			3A-N-A	

Tabela 12. Tabela com massas obtidas para as frações recolhidas.

Nome da fração	Massa obtida da fração	pH
1F-R	14,0 mg	3
2F-R	1,0 mg	3
3F-R	12,8 mg	3
1A-R	11,2 mg	1
2A-R	1,6 mg	1
3A-R	3,2 mg	1
1A-L	1,8 mg	4-5
2A-L	0,4 mg	4-5
3A-E	1,4 mg	4-5

Como é possível observar na **Tabela 12** as frações evaporadas no evaporador rotativo possuem muito mais massa do que as que foram evaporadas no liofilizador ou na linha de azoto, isto pode dever-se ao facto de não existir a evaporação das moléculas de ácido fórmico e trifluoroacético

das respectivas amostras, o que pode ser verificado pelo pH de ambas as frações. Já nas amostras que foram submetidas à evaporação no liofilizador e na linha de azoto (1A-L, 2A-L e 3A-E) as massas são muito menores e o pH não é tão ácido do que as mesmas frações que sofreram outro processo de evaporação (1A-R, 2A-R e 3A-R).

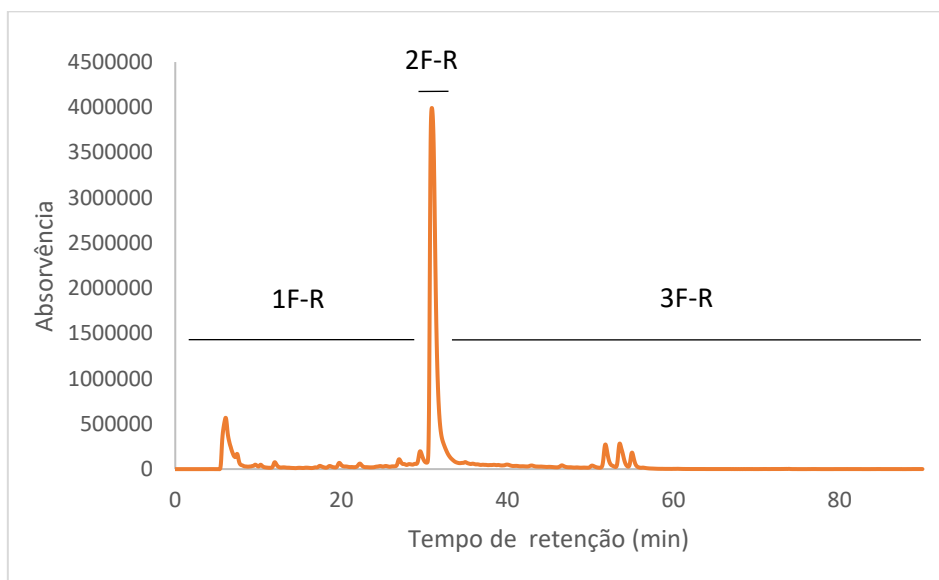


Figura 23. Cromatograma do extrato *P. zuluensis* com o método descrito em “4.2.4.2. Isolamento de frações da amostra de *P. zuluensis*” com o eluente metanol: ácido fórmico.

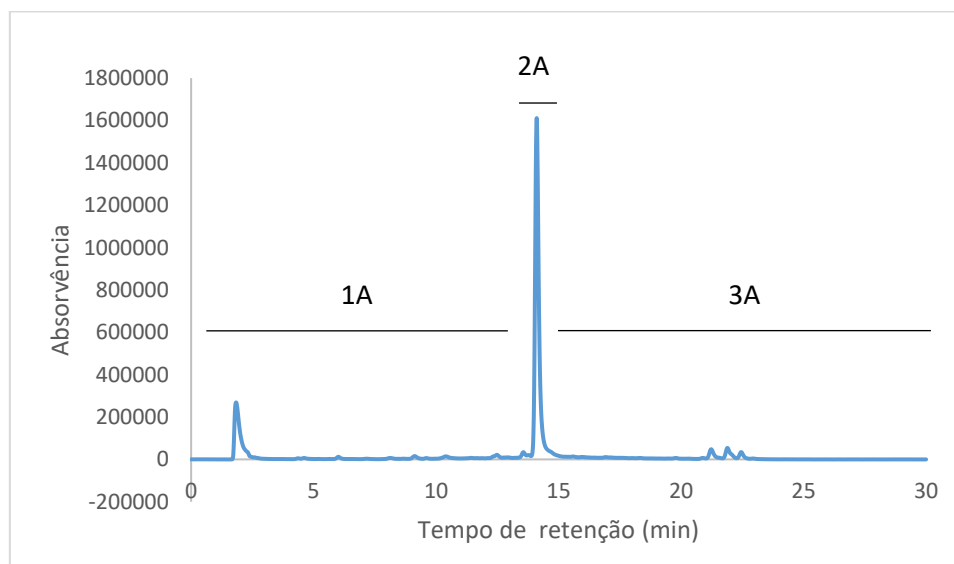


Figura 24. Cromatograma do extrato *P. zuluensis* com o método descrito em “4.2.4.1. Análise cromatográfica das decoções das diferentes espécies de *Plectranthus*”, com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

Posteriormente procedeu-se ao isolamento de frações através do HPLC-RP-DAD como descrito em “4.2.4.2. Isolamento de frações da amostra de *P. zuluensis*”. As primeiras frações recolhidas foram as frações isoladas (fração 1F, fração 2F e fração 3F) no método que possuía como eluente metanol e ácido fórmico e analisadas cromatograficamente com o mesmo eluente (fração 1F-R-F, fração 2F-R-F e fração 3F-R-F), sendo os resultados apresentados na **Figura 25**, na **Figura 26** e na **Figura 27**, respetivamente.

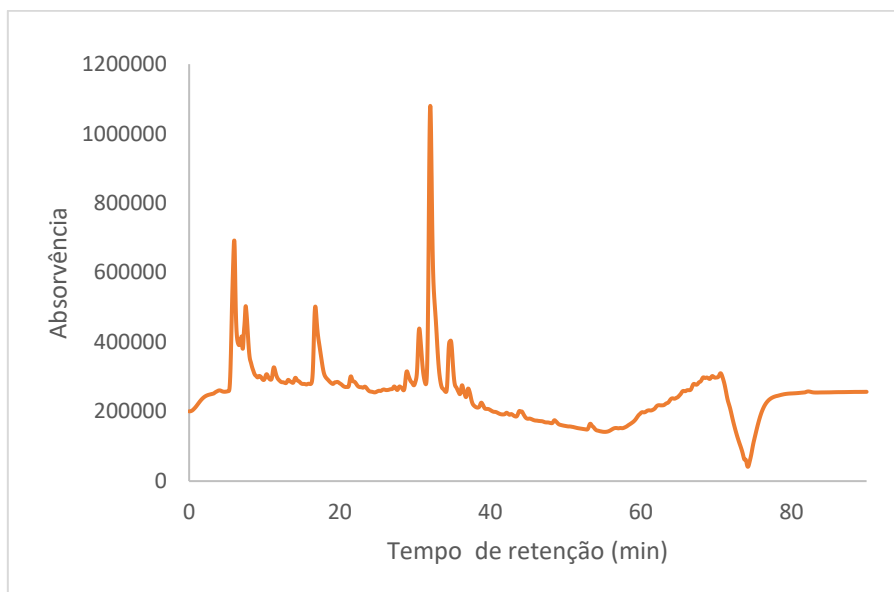


Figura 25. Cromatograma da fração 1F-R-F recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido fórmico.

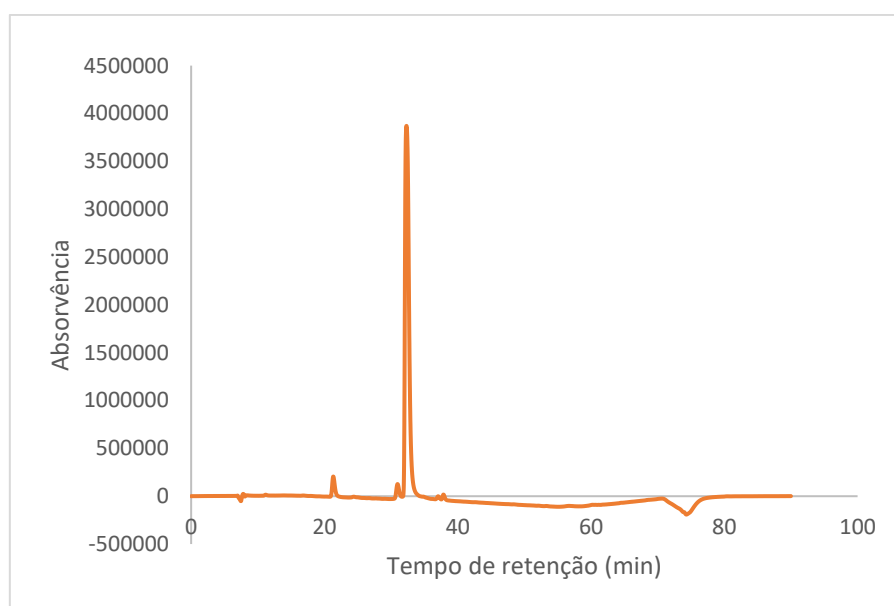


Figura 26. Cromatograma da fração 2F-R-F recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido fórmico.

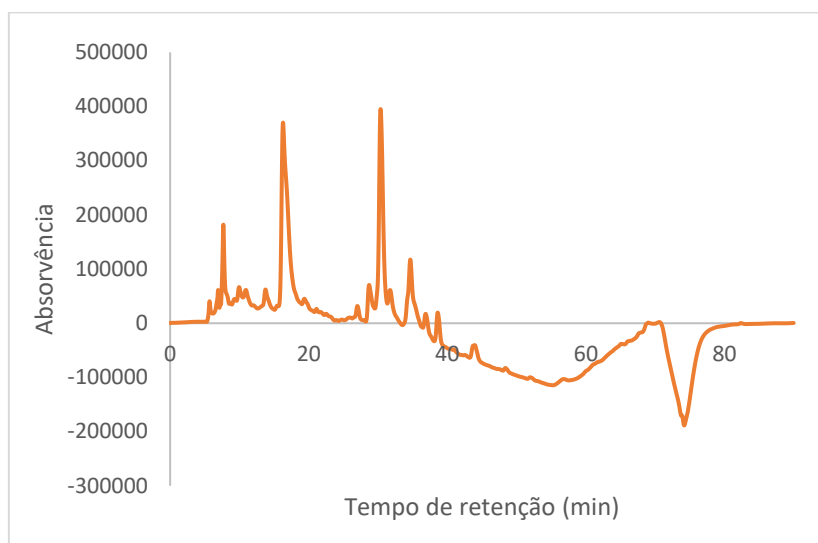


Figura 27. Cromatograma da fração 3F-R-F recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido fórmico.

Observando a **Figura 25**, a **Figura 26** e a **Figura 27** e comparando com a **Figura 23** verifica-se que existe uma alteração de perfil cromatográfico tanto da fração 1F-R-F como da fração 3F-R-F, já a fração 2F-R-F não sofre qualquer tipo de alteração. Estas alterações verificadas podem ter ocorrido devido ao método escolhido para o isolamento das frações, sendo que a possível presença do ácido fórmico e a possível reação do mesmo com os compostos existentes na amostra formando novos compostos que absorvem na região do UV-Vis de outra forma e noutro tempo de retenção ou ainda devido ao método de secagem das frações que envolvia o uso de um evaporador rotativo a 40 °C uma vez que os compostos existentes na decocção de *P. zuluensis* podem ser termolábeis.

Relativamente às frações recolhidas com eluente metanol e ácido fórmico mas analisadas cromatograficamente com o eluente de metanol e ácido trifluoroacético, os resultados encontram-se apresentados na **Figura 28**, na **Figura 29** e na **Figura 30**.

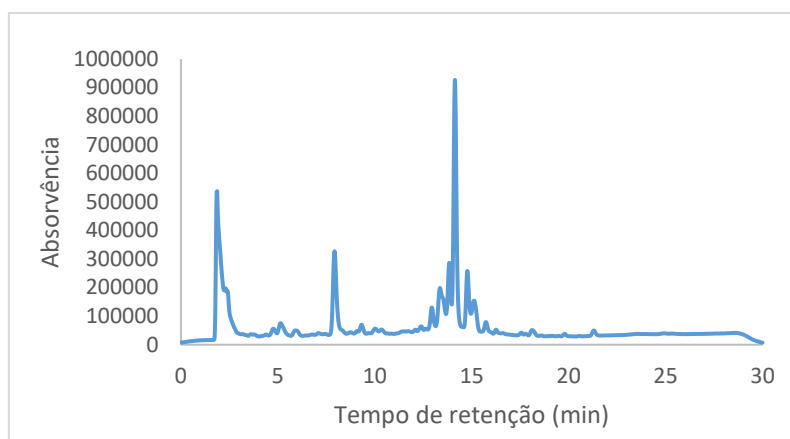


Figura 28. Cromatograma da fração 1F-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

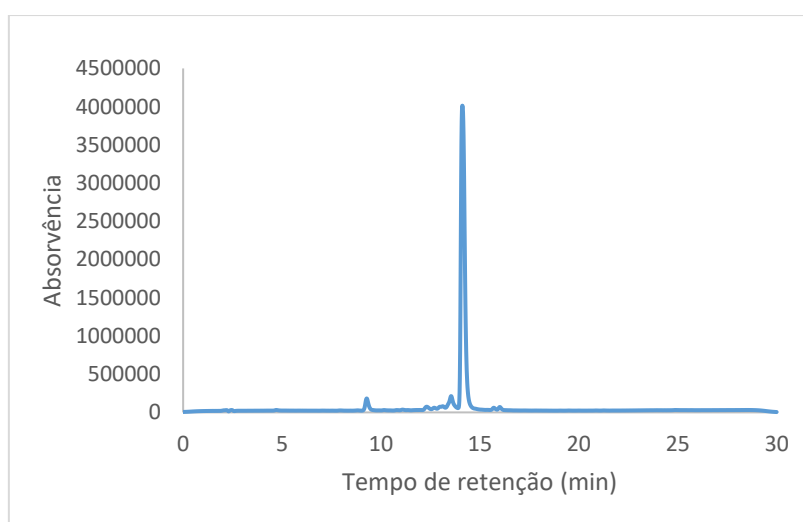


Figura 29. Cromatograma da fração 2F-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

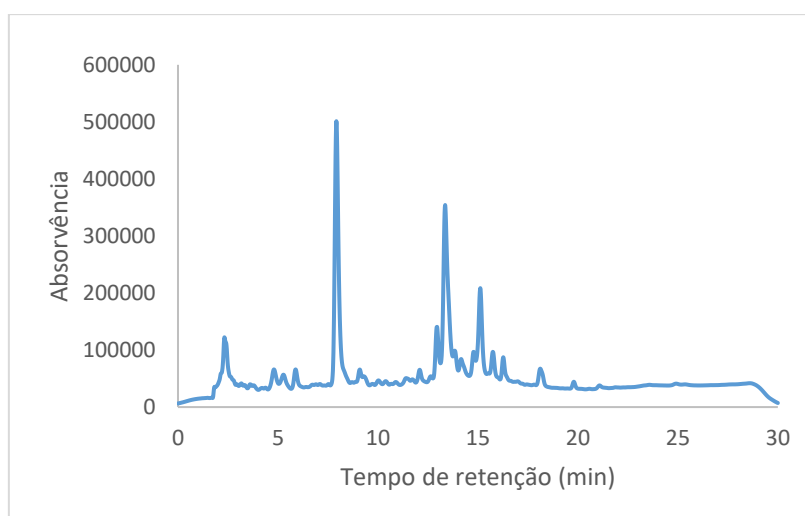


Figura 30. Cromatograma da fração 3F-R-A recolhida com o eluente metanol: ácido fórmico, evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

Observando a **Figura 28**, a **Figura 29** e a **Figura 30** verifica-se que também existe uma alteração do perfil cromatográfico das frações recolhidas comparativamente com a **Figura 24**, excetuando a fração 2F-R-A, mas que comparativamente com a **Figura 25**, a **Figura 26** e a **Figura 27** não existe uma alteração do perfil cromatográfico entre as primeiras e as últimas.

De forma a verificar as hipóteses que se tinham proposto para as alterações cromatográficas existentes nas frações recolhidas, recolheu-se novas frações desta vez usando como eluente metanol e ácido trifluoroacético como descrito em “4.2.4.1. Análise cromatográfica das decocções das diferentes espécies de *Plectranthus*”, estas frações foram subdivididas em três e cada uma destas foi tratada de forma diferente. As amostras evaporadas no evaporador rotativo a 40 °C (fração 1A-R-A, fração 2A-R-A, fração 3A-R-A) foram analisadas cromatograficamente com o mesmo método de HPLC sendo que os resultados são apresentados na **Figura 31**, na **Figura 32** e na **Figura 33**, respetivamente.

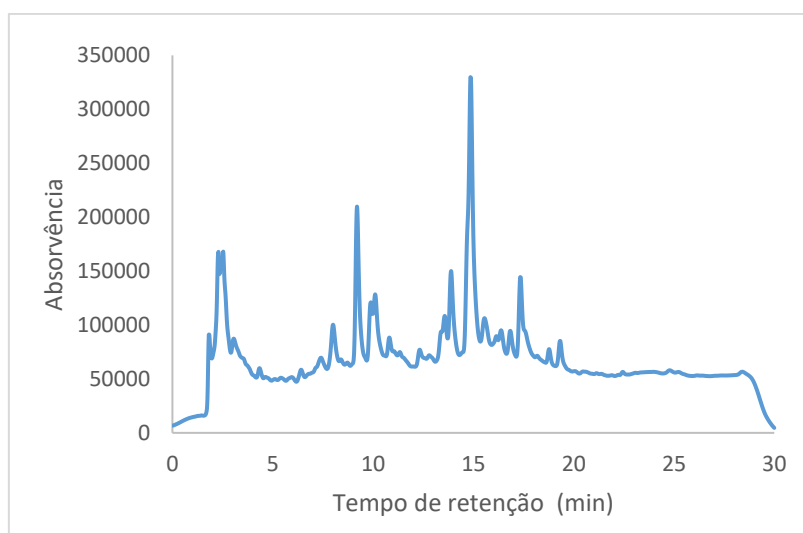


Figura 31. Cromatograma da fração 1A-R-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

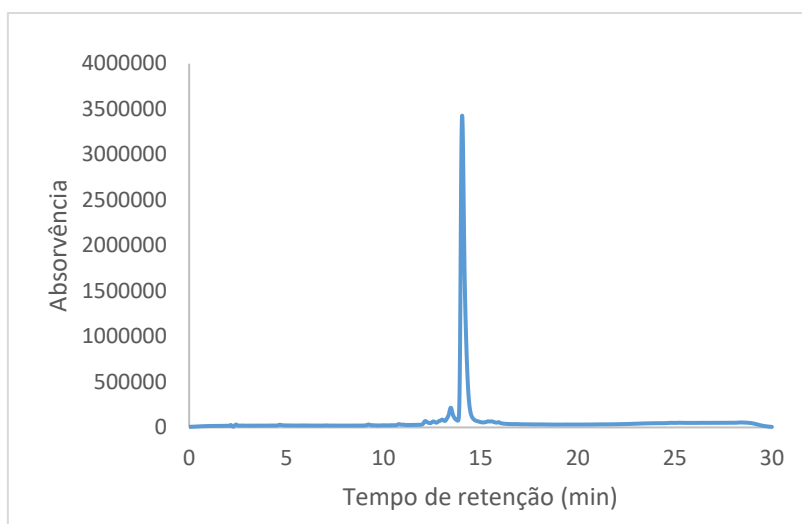


Figura 32. Cromatograma da fração 2A-R-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

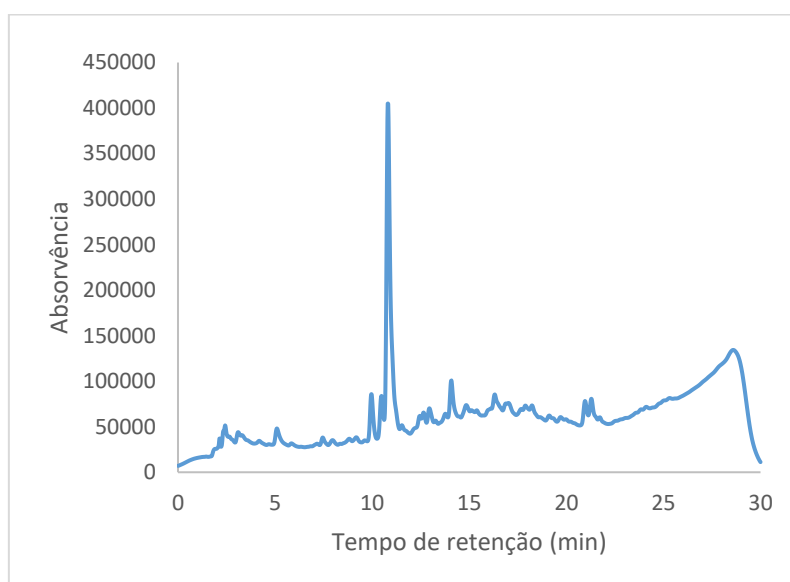


Figura 33. Cromatograma da fração 3A-R-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no evaporador rotativo a 40 °C e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

Comparando a **Figura 31**, a **Figura 32** e a **Figura 33** com a **Figura 24** observa-se que apenas a fração 2A-R-A mantém o perfil cromatográfico. As alterações do perfil cromatográfico podem dever-se então ao aquecimento a 40 °C que as frações sofrem quando são evaporadas no evaporador rotativo ou á presença de moléculas do solvente na amostra e de produtos de reações que daí podem resultar.

Relativamente às frações que foram evaporadas no liofilizador e na linha de azoto (fração 1A-L-A, fração 2A-L-A, fração 3A-E-A, respetivamente) os resultados cromatográficos encontram-se apresentados na **Figura 34**, na **Figura 35** e na **Figura 36**. A fração 3A-E-A não pôde ser liofilizada uma vez que possuía um elevado valor alcoólico o que impede a liofilização, assim evaporou-se na linha de azoto.

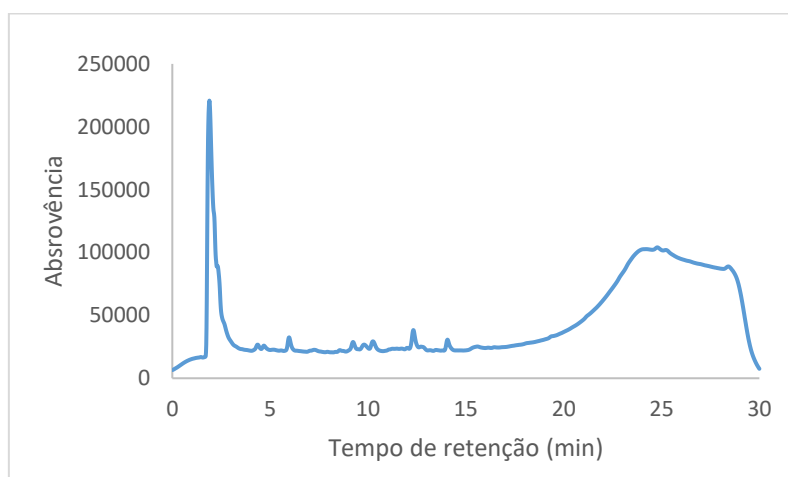


Figura 34. Cromatograma da fração 1A-L-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no liofilizador e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

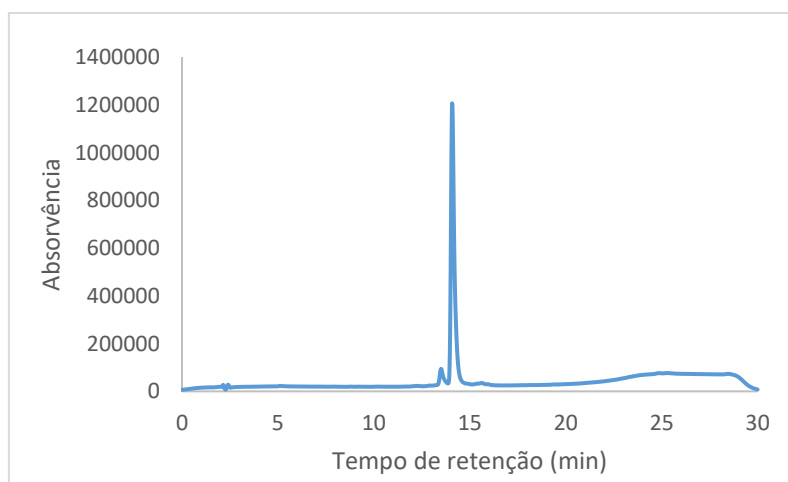


Figura 35. Cromatograma da fração 2A-L-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada no liofilizador e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

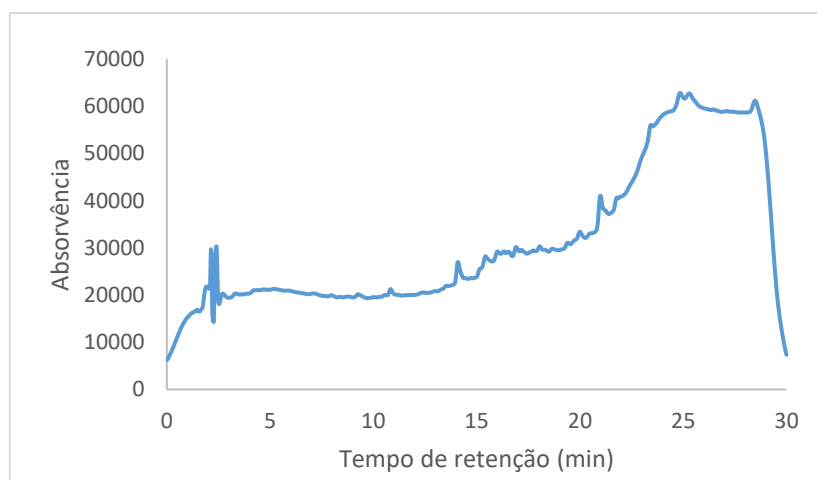


Figura 36. Cromatograma da fração 3A-E-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, com evaporada na linha de N₂ e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

Comparando a **Figura 34**, a **Figura 35** e a **Figura 36** com a **Figura 24** observa-se que as frações 1A-L-A e 2A-L-A não sofrem qualquer alteração do seu perfil cromatográfico, não se verificando o mesmo para a fração 3A-E-A. Esta alteração pode dever-se ao facto de os compostos existentes na fração 3A serem muito instáveis degradando-se ao longo do tempo ou com a evaporação através da linha de azoto.

Relativamente às frações não evaporadas (fração 1A-N-A, fração 2A-N-A e fração 3A-N-A) foram analisadas cromatograficamente e os resultados encontram-se enunciados na **Figura 37**, na **Figura 38** e na **Figura 39**.

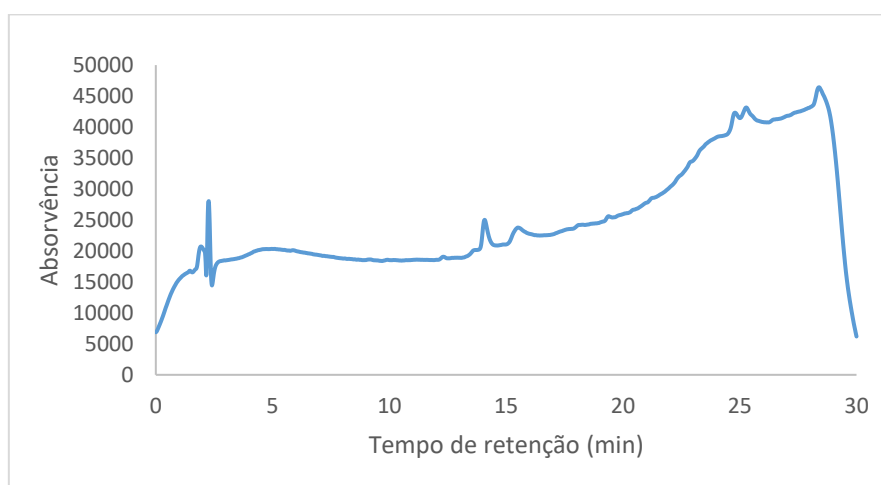


Figura 37. Cromatograma da fração 1A-N-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, não sofrendo qualquer tipo de evaporação e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

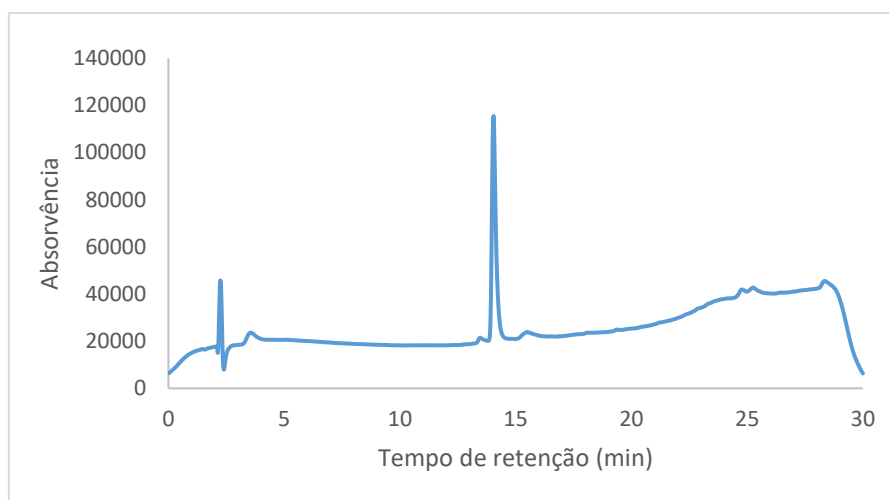


Figura 38. Cromatograma da fração 2A-N-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, não sofrendo qualquer tipo de evaporação e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

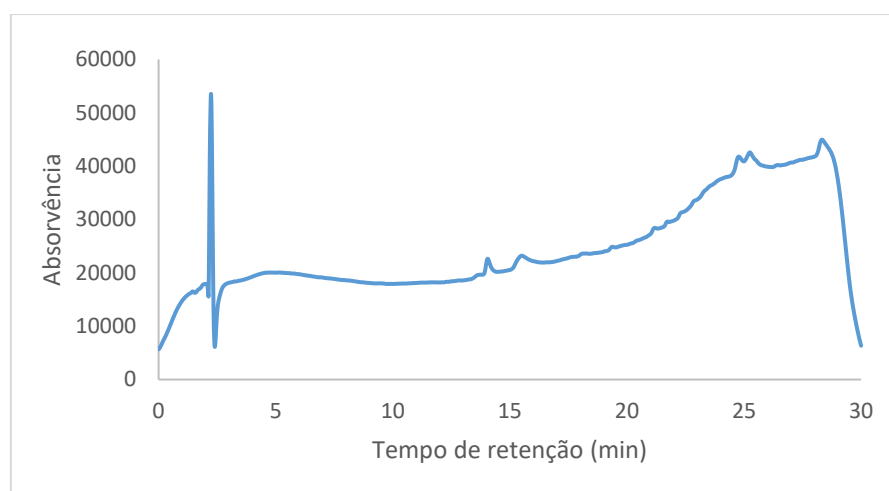


Figura 39. Cromatograma da fração 3A-N-A recolhida metanol: ácido trifluoroacético, não sofrendo qualquer tipo de evaporação e analisada com o eluente metanol: ácido trifluoroacético.

Observando a **Figura 37**, a **Figura 38** e a **Figura 39** e comparando com a **Figura 24** verifica-se que apenas na fração 2A-N-A não sofreu alteração de perfil cromatográfico. As frações 1A-N-A e 3A-N-A apresentam perfis cromatográficos muito semelhantes, e que em nada são semelhantes com os perfis esperados das frações. Esta semelhança pode dever-se ao facto de os compostos estarem demasiado diluídos e não conseguirem ser detetados no HPLC.

Concluindo, a fração que apresentou maiores semelhanças com o cromatograma inicial foi a 1A-L, assim presume-se que o melhor método de recolha é o que possui como eluente metanol: ácido trifluoroacético e o melhor método de evaporação é o liofilizador.

5.1.7.1. Ensaio cinético de acetilcolinesterase das frações *P. zuluensis*

Uma vez que o *P. zuluensis* apresentava um valor de IC₅₀ muito baixo e que a concentração de ácido rosmarínico existente no extrato apenas justificava 28,36 %, decidiu-se testar as frações isoladas de forma a tentar perceber qual a fração mais ativa.

Na realização do ensaio cinético das frações, não foi possível realizar o ensaio com todas as frações recolhidas uma vez que não existia massa suficiente das frações. As únicas frações que se conseguiram utilizar para determinar o IC₅₀ foram as frações 1F-R e 3F-R, ou seja, frações 1 e 3 recolhidas no eluente metanol: ácido fórmico e evaporadas no evaporador rotativo a 40 °C, sendo os valores encontram-se enunciados na **Tabela 13**. A fração 1A-R também poderia ter sido usada para determinar o IC₅₀ contudo decidiu-se não o determinar uma vez que o perfil cromatográfico desta fração era bastante distinto do apresentado na amostra de *P. zuluensis*.

Tabela 13. Valores de IC₅₀ para o ensaio da acetilcolinesterase para as frações 1F-R e 3F-R.

Amostra	Valor de IC ₅₀ (mg/mL)
Fração 1F-R	1,06 ± 0,02
Fração 3F-R	0,50 ± 0,06

O valor de IC₅₀ do *P. zuluensis* é de 0,08 ± 0,05 mg/mL enquanto que os valores e IC₅₀ das frações é superior a este valor. Esta alteração de valores faz algum sentido uma vez que os cromatogramas destas frações em nada se assemelham ao cromatograma esperado, o que levaria a prever que as atividades iriam ser díspares. Assim estas atividades não refletem na realidade a atividade do extrato.

Posteriormente testou-se a fração 1A-L, sendo que esta apresentou uma percentagem de inibição de 35,30 ± 0,05 % com uma concentração de 0,1 mg/mL. A percentagem de inibição desta fração já se encontra mais próxima do valor de IC₅₀ da decocção *P. zuluensis*, o que seria de esperar devido à semelhança entre o cromatograma da fração 1A-L e do cromatograma de *P. zuluensis* entre os tempos de retenção 0 e 13 min. De qualquer forma foi testado o *P. zuluensis* na concentração de 0,07 mg/mL e apresenta uma percentagem de inibição muito semelhante à obtida para a fração 1A-L, como é possível observar na **Tabela 14**. O que sugere que grande

parte da atividade do *P. zuluensis* deve-se aos compostos existentes na fração 1, sendo que a decocção no seu todo apresenta uma atividade inibitória maior. Em estudos realizados anteriormente, identificou-se o composto medioresinol (**Figura 40**) sendo que o seu tempo de retenção eram aos 19,56 minutos com o método metanol: ácido fórmico no método descrito em “4.2.4.2. Isolamento de frações da amostra de *P. zuluensis*” assim este composto pertence à fração 1.⁸⁰ O medioresinol é um dos compostos pertence à classe dos lignanos e segundo estudos de *docking* realizados consegue entrar e ajustar-se ao centro ativo do enzima acetilcolinesterase que justifica a grande atividade da fração 1.⁹²

Tabela 14. Tabela com a percentagem de inibição utilizando *P. zuluensis* (0,07 mg/mL) e a fração 1A-L (0,1 mg/mL).

Amostra	Percentagem de inibição (%)
<i>P. zuluensis</i>	36,03 ± 0,07
Fração 1A-L	35,30 ± 0,05

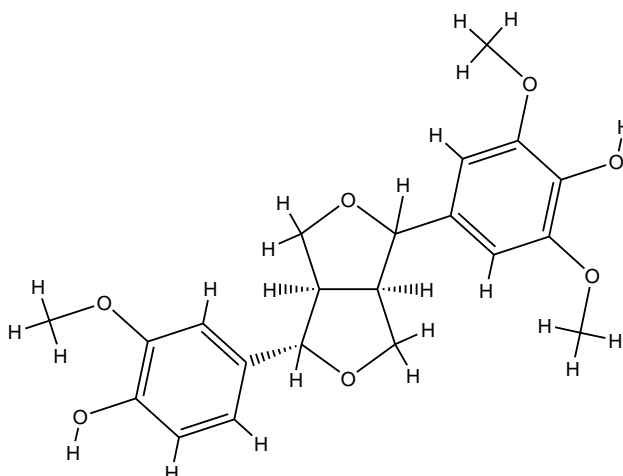


Figura 40. Estrutura do medioresinol.

Com base nos resultados obtidos neste estudo verifica-se que a forma de evaporação das frações é extremamente importante para a atividade da fração, sendo que o processo de liofilização mostrou ser o mais apropriado uma vez que não altera a estrutura química dos compostos existentes na fração.

5.1.8. Citotoxicidade em diferentes linhas celulares

Para uma correta análise das decocções em estudo é importante perceber se alguma possuía caracter tóxico para o ser humano, realizou-se ensaios com duas linhas celulares diferentes utilizando o protocolo experimental descrito em “4.2.12. Citotoxicidade em diferentes linhas celulares”, sendo os resultados apresentados **Figura 41** e na **Tabela 15**.

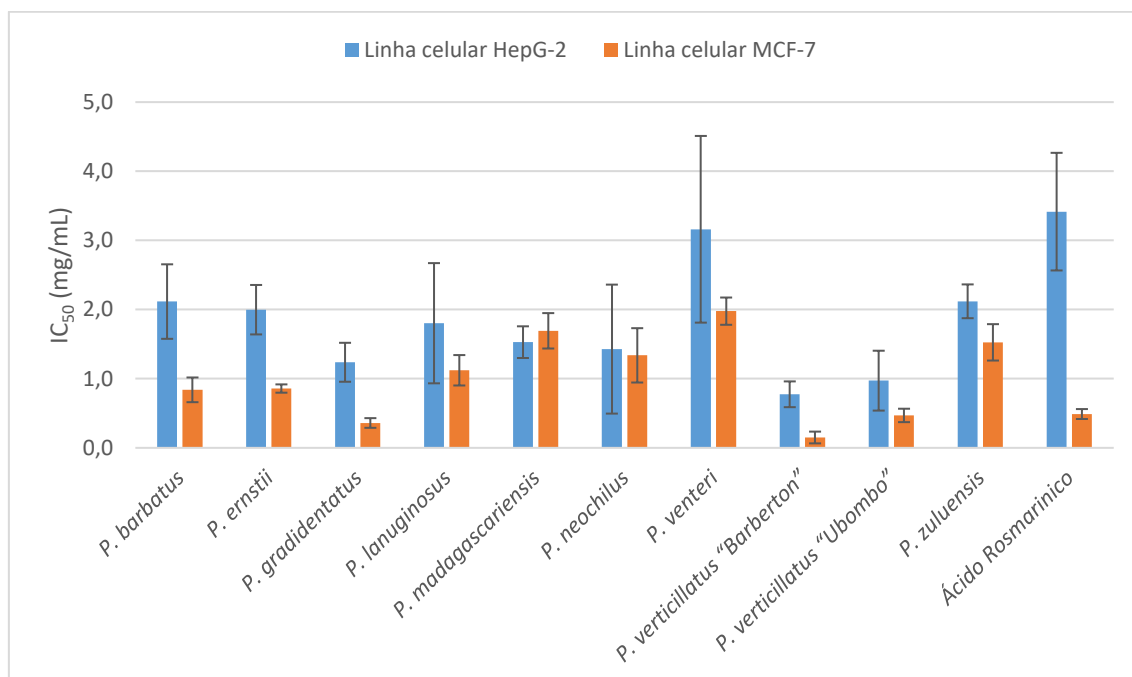


Figura 41. Gráfico com os resultados da citotoxicidade nas linhas celulares MCF-7 e HepG-2.

Tabela 15. Tabela com os valores de IC₅₀ para cada linha celular e a respetiva análise estatística, amostras identificadas com letras iguais não são diferentes estatisticamente.

Amostra	Linha celular MCF-7 (mg/mL)	Linha celular HepG-2 (mg/mL)
<i>P. barbatus</i>	0,84 ± 0,18 ^A	2,12 ± 0,54 ^A
<i>P. ernstii</i>	0,86 ± 0,06 ^{A,B}	2,00 ± 0,36 ^{A,B}
<i>P. gradidentatus</i>	0,36 ± 0,07 ^C	1,24 ± 0,28 ^{A,B,C}
<i>P. lanuginosus</i>	1,12 ± 0,22 ^{A,B,D}	1,80 ± 0,87 ^{A,B,C,D}
<i>P. madagascariensis</i>	1,69 ± 0,26 ^E	1,53 ± 0,23 ^{A,B,C,D,E}
<i>P. neochilus</i>	1,34 ± 0,39 ^{D,F}	1,43 ± 0,93 ^{A,B,D,F}
<i>P. venterii</i>	1,98 ± 0,20 ^E	3,16 ± 1,35 ^{A,G}
<i>P. verticillatus</i> “Barborton”	0,15 ± 0,09 ^{C,G}	0,77 ± 0,19 ^{C,D,E,F,H}
<i>P. verticillatus</i> “Ubombo”	0,47 ± 0,10 ^{C,G,H}	0,97 ± 0,43 ^{B,D,E,F,H}
<i>P. zuluensis</i>	1,53 ± 0,26 ^{E,F}	2,12 ± 0,24 ^{A,B,D,E,F,G}
Ácido Rosmarínico	0,49 ± 0,07 ^{C,H}	3,42 ± 0,85 ^G

Como é possível observar na **Figura 41** e na **Tabela 15**, nenhum dos extratos é citotóxico para as linhas celulares testadas, uma vez que o limite biológico de toxicidade é de 0,1 mg/mL.⁹³ O extrato que apresentou um valor de IC₅₀ mais baixo para ambas as linhas celulares foi o *P. verticillatus* cultivar “Barborton”, apresentando um valor de 0,15 ± 0,09 mg/mL para o caso da linha celular MCF-7 e um valor de 0,77 ± 0,19 mg/mL para o caso da linha celular HepG-2. Já o extrato que possui um maior valor de IC₅₀ é o extrato da planta *P. venterii*, apresentando um valor de 1,98 ± 0,20 mg/mL para o caso da linha celular MCF-7 e um valor de 3,16 ± 1,35 mg/mL para o caso da linha celular HepG-2. As diferenças de IC₅₀ verificadas entre as linhas celulares deve-se ao tipo de células e à constituição de cada célula, as células do fígado normalmente são mais resistentes uma vez que possuem mais mecanismos de degradação de agentes tóxicos (por exemplo, o enzima citocromo P450) do que as células mamárias. Os resultados apresentados são coerentes com os resultados reportados na bibliografia por El-hawary *et al.* em 2012.²⁰

5.2. Influência de decocções de *P. barbatus* e *P. zuluensis* na estrutura de proteínas

5.2.1. Análise da estrutura de proteínas por FT-IR

Para estudar a influência de diferentes decocções na estrutura a proteína procedeu-se à análise através de FT-IR segundo o procedimento descrito em “4.2.5. Análise da estrutura de proteínas por FT-IR”, escolhendo-se para este ensaio apenas as decocções de *P. barbatus* e *P. zuluensis* por possuírem constituições muito diferentes em diferentes concentrações e utilizando várias temperaturas.

Relativamente à decocção de *P. barbatus* os resultados encontram-se apresentados **Figura 42**. Como é possível observar na **Figura 42**, não existe grande alteração nos espectros às temperaturas de 25 °C, 37 °C e 55 °C, quer com o aumento de temperatura, quer com o aumento de concentração da decocção. Já nas temperaturas de 70 °C e 100 °C é possível observar um aparecimento de uma banda ao número de onda de 1624 cm⁻¹, esta banda consiste apenas num aumento de absorvência significativo. Na temperatura de 70 °C a banda a 1624 cm⁻¹ é mais intensa na concentração de 4 mg/mL do que nas concentrações de 0,4 e 2 mg/mL. O aparecimento desta banda significa uma mudança conformacional na estrutura da proteína (aumento do conteúdo em folhas-β). A BSA é essencialmente composta por hélices-α, quando sujeita diferentes agentes a sua estrutura pode mudar, formando-se folhas-β, por exemplo. O aumento da banda a 1624 cm⁻¹ é proporcional com a temperatura e com o aumento da concentração de decocção. De modo a ser mais visível os resultados obtidos realizaram-se rácios de absorvência entre os números de onda de 1624 cm⁻¹ e 1655 cm⁻¹ para todas as temperaturas para o *P. barbatus*, sendo os resultados apresentados na **Figura 43**. O rácio das absorvências entre os números de onda 1624 cm⁻¹ e 1655 cm⁻¹ traduz a absorvência das folhas-β sobre a absorvência de hélices-α.

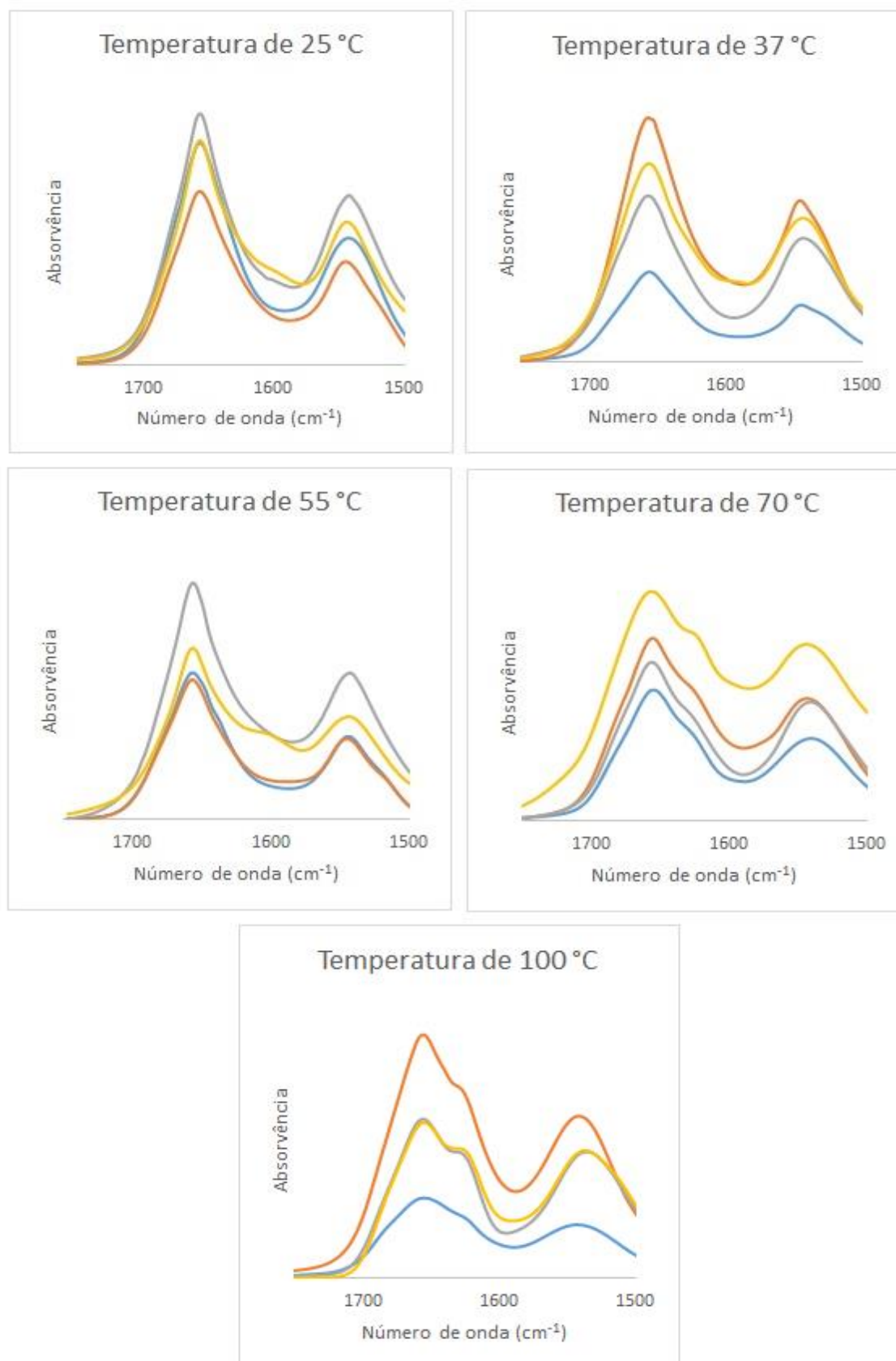


Figura 42. Gráfico de FT-IR das amostras BSA (linha azul), BSA + *P. barbatus* 0,4 mg/mL (linha laranja), BSA + *P. barbatus* 2 mg/mL (linha cinzenta), BSA + *P. barbatus* 4 mg/mL (linha amarela) a diferentes temperaturas.

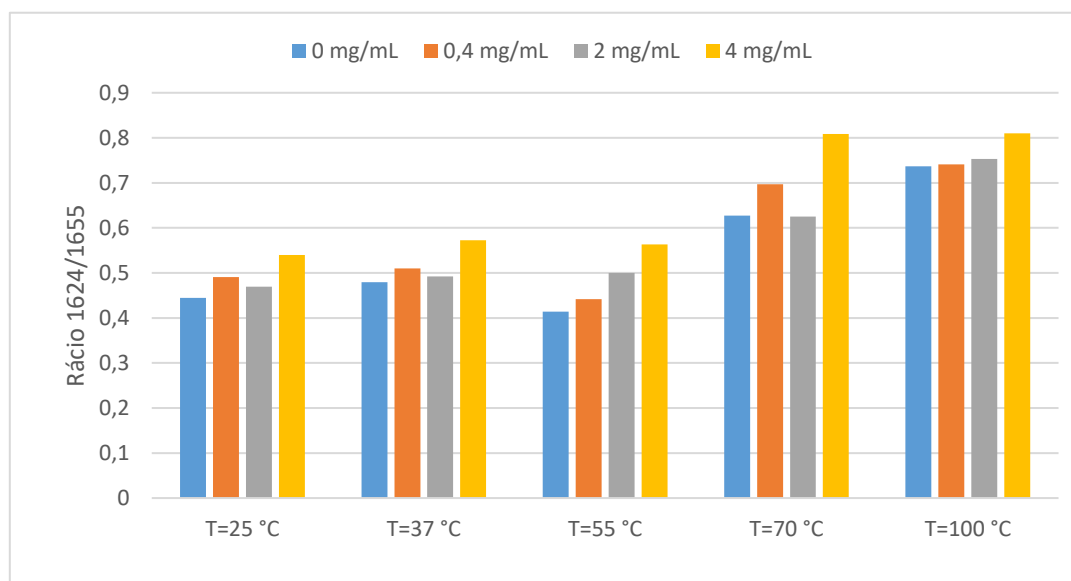


Figura 43. Rácios das estruturas β/α para amostra de BSA com as diferentes concentrações de *P. barbatus*.

Como é possível observar na **Figura 43** existe um aumento do valor do rácio 1624/1655 consoante o aumento de concentração de decoção a todas as temperaturas testadas. Com o aumento de temperatura também é possível observar o aumento deste rácio. Assim verifica-se o aumento das folhas- β relativamente às hélices- α , consoante o aumento da temperatura e o aumento da concentração da decoção.

Para além de se testar o efeito do *P. barbatus* testou-se também o efeito do *P. zuluensis* sobre a estrutura proteica da proteína, uma vez que estes extratos possuem componentes bastante diferentes apesar de o componente maioritário ser o mesmo e de existir em diferentes concentrações nos extratos (**Tabela 6**). Os espectros do FT-IR encontram-se apresentados **Figura 44**, nestes espectros é possível observar que, à semelhança do que acontece com as amostras de *P. barbatus*, as amostras que foram submetidas às temperaturas de 25 °C, 37 °C e 55 °C não apresentam nenhuma alteração do espectro, não existindo assim nenhuma alteração conformacional na proteína. Já nas amostras de 70 °C e 100 °C observa-se o surgimento da banda 1624 cm^{-1} , o que já era esperado de acordo com os resultados obtidos para o extrato do *P. barbatus*. A banda relativa às folhas- β aumenta consoante o aumento de concentração de extrato na amostra, contudo a amostra de concentração 4 mg/mL de *P. zuluensis* submetida a 70 °C esta banda não é muito clara, talvez devido a uma subtração deficiente de espectros da amostra e do branco. Já na amostra de 100 °C esta banda é bastante explícita, principalmente quando se compara com a banda que é possível observar no espectro da amostra de 100 °C com

a decocção de *P. barbatus* na concentração de 4 mg/mL. Comparando todos os espectros da **Figura 42** e da **Figura 44**, observa-se que o efeito gerado na proteína pela decocção de *P. zuluensis* é superior ao efeito causado pela decocção de *P. barbatus*. Assim pode-se afirmar que os compostos presentes na decocção de *P. zuluensis* possuem maior efeito sobre a proteína, quando associado ao efeito da temperatura, do que os compostos presentes na decocção do *P. barbatus*.

À semelhança do tratamento de dados realizado para as amostras com *P. barbatus*, também se realizou os rácios β/α para as amostras contendo *P. zuluensis*, sendo os resultados apresentados na **Figura 45**. Nesta figura é possível observar que a tendência verificada para a decocção de *P. barbatus* não se mantêm totalmente, apenas se verifica o aumento de folhas- β relativamente às hélices- α com o aumento de temperatura. Com o aumento da concentração da decocção observa-se uma diminuição do valor do rácio β/α , sendo que a concentração de 4 mg/mL de *P. zuluensis* apresenta valores muito baixos relativamente às outras concentrações. À temperatura de 25 °C o rácio para a concentração de 4 mg/mL apresenta um valor negativo, assim pode-se afirmar que o número de hélices- α é muito superior ao número de folhas- β . O facto de no espectro do FT-IR a 25 °C a linha correspondente à concentração de 4 mg/mL se encontrar com uma absorvência muito inferior a todas as outras concentrações também tem influência no valor do rácio.

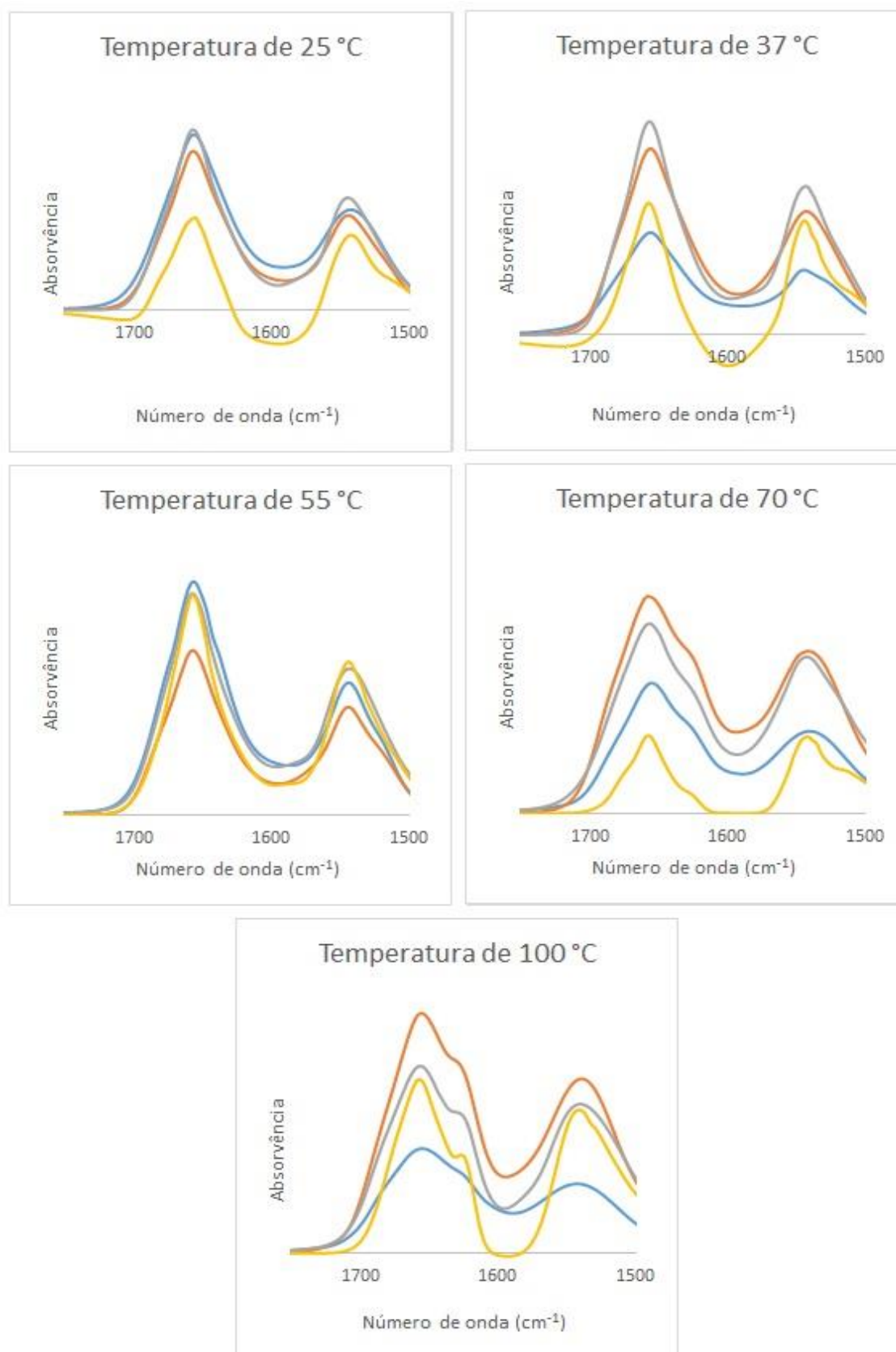


Figura 44. Gráfico de FT-IR das amostras BSA (linha azul), BSA + *P. zuluensis* 0,4 mg/mL (linha laranja), BSA + *P. zuluensis* 2 mg/mL (linha cinzenta), BSA + *P. zuluensis* 4 mg/mL (linha amarela) a diferentes temperaturas.

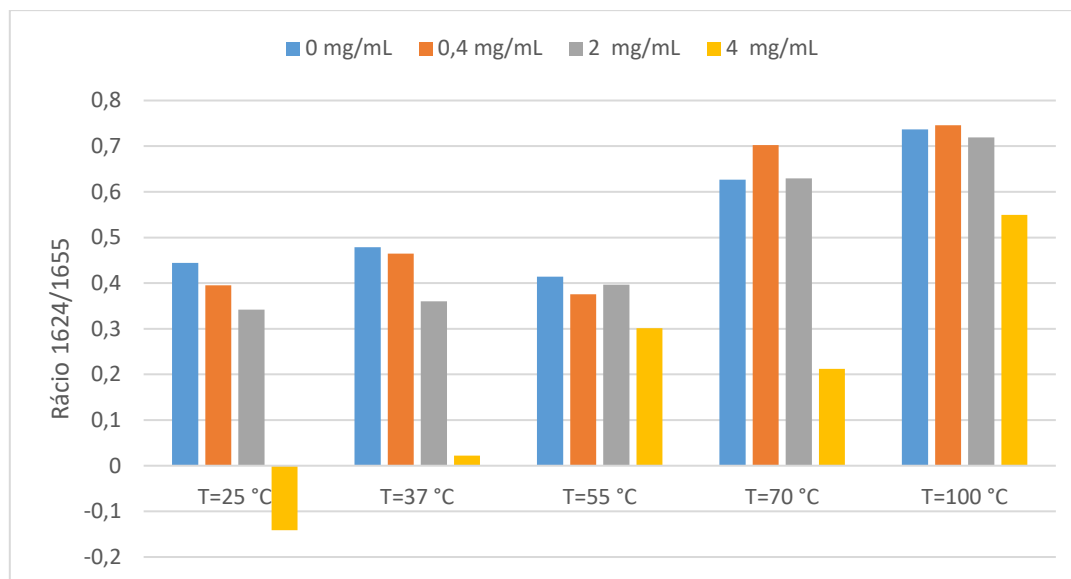


Figura 45. Rádios das estruturas β/α para amostra de BSA com as diferentes concentrações de *P. zuluensis*.

Na bibliografia já desde a década de 80 que são referidas ligações entre proteínas e compostos fenólicos, e o estudo destas interações tem continuado e foi estudado por variadíssimos métodos.⁹⁴ A espectroscopia de FT-IR é muito utilizada para o estudo da desnaturação de proteínas e para tentar perceber se existe ou não a ligação de substâncias a proteínas. Garidel *et al.* em 2006 publicaram um estudo que realizaram utilizando α -lactalbumina e iões de magnésio, a ligação destes à proteína é claramente observada no espectro de FT-IR devido a uma alteração na banda da amida I,⁹⁵ o que também é possível observar nos resultados obtidos nesta dissertação.

Relativamente a estudos realizados com polifenóis, Zorilla *et al.* em 2011 estudaram a β -lactalbumina em conjunto com a EGCG e perceberam que concentrações de EGCG duas vezes superiores à concentração de proteína não causam efeitos significativos na estrutura secundária da proteína, contudo concentrações dez vezes maiores já causam alterações na estrutura secundária da proteína. Em simultâneo testaram também o efeito da temperatura e observaram que consoante o aumento de temperatura mais alterações conformacionais surgiam, nomeadamente folhas- β antiparalelas. Para além destas alterações conformacionais observaram também a formação de agregados proteicos.⁵⁹ Comparando os resultados descritos na dissertação com os resultados obtidos por Zorilla *et al.* verifica-se que são semelhantes,

apesar das proteínas e dos polifenóis serem diferentes. Roy *et al.* em 2012 estudaram o efeito de duas catequinas (catequina e epicatequina) na BSA e na HSA e verificaram que existiram alterações conformacionais.⁹⁶ Já Falé *et al.* em 2011 realizaram um estudo sobre a interação entre a decocção de *P. barbatus* e dos seus padrões com duas proteínas (HSA e lisozima), neste estudo verificaram que a estrutura terciária das proteínas era afetada tanto pela decocção como pelos padrões, enquanto que a estrutura secundária não sofria alterações.⁶¹

Nos estudos realizados no presente trabalho percebe-se que as alterações conformacionais só ocorrem a temperaturas superiores a 55 °C e que para o caso do *P. zuluensis* essas alterações mantêm-se relativamente à amostra sem decocção (excetuando a concentração de 4 mg/mL), o que parece garantir uma certa estabilidade da proteína. Já na amostra de *P. barbatus* o mesmo não se verifica. Estas diferenças podem dever-se à diferença de composição dos extratos, nomeadamente a presença do medioresinol na decocção do *P. zuluensis*.

5.2.1.1. Atividades biológicas

5.2.1.1.1. Ensaio cinético da acetilcolinesterase

De modo a verificar a influência da presença de proteína realizou-se o ensaio cinético da acetilcolinesterase com as amostras utilizadas para fazer o ensaio de FT-IR. Os resultados encontram-se apresentados na **Figura 46** para ambas as concentrações de *P. barbatus* (concentração de 2 mg/mL - **Figura 47** e concentração de 4 mg/mL - **Figura 48**) e na **Figura 49** para ambas as concentrações de *P. zuluensis* (concentração de 2 mg/mL - **Figura 50** e concentração de 4 mg/mL - **Figura 51**). As concentrações de 0,4 mg/mL das decocções de *P. barbatus* e *P. zuluensis* com BSA e sem BSA não foram testadas no ensaio cinético uma vez que esta concentração é muito inferior do valor obtido de IC₅₀ das decocções isoladas (no caso do *P. barbatus*) e apresentavam muito erro uma vez que os compostos bioativos encontravam-se numa concentração muito baixa (no caso do *P. zuluensis*).

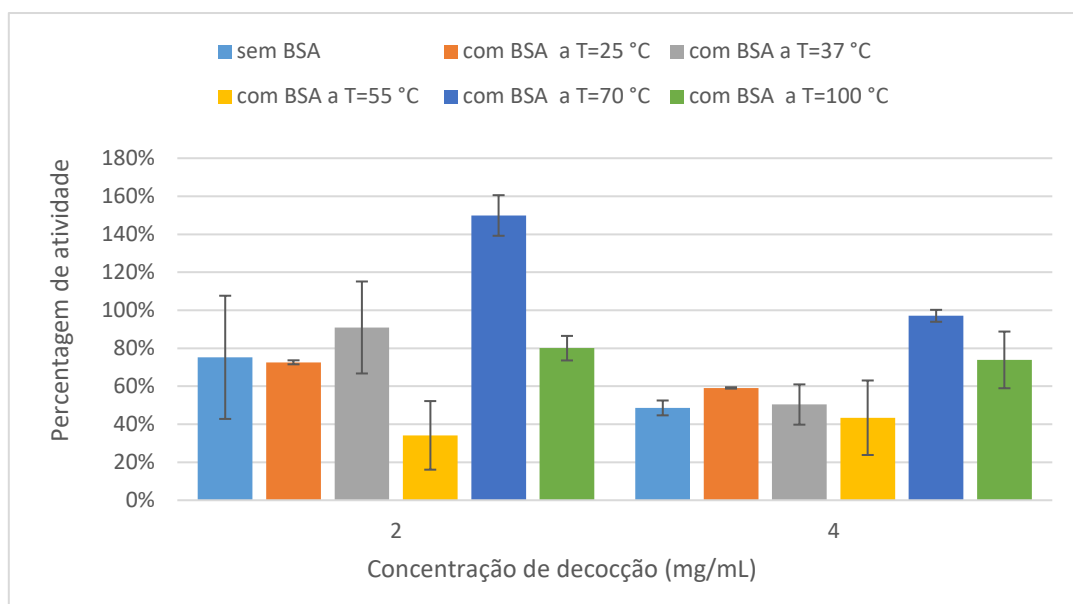


Figura 46. Gráfico de percentagem de atividade do enzima AChE na presença das diferentes amostras de BSA com a decocção de *P. barbatius* testadas no FT-IR.

Observando a **Figura 46** verifica-se que a percentagem de atividade da amostra que não possui BSA em solução é inferior à percentagem de atividade do enzima com as amostras que possuem BSA (exceto na amostra sem BSA de 2 mg/mL de decocção em solução). Assim pode-se afirmar que a BSA tem um efeito estabilizador do enzima acetilcolinesterase, sendo que a sua percentagem de atividade é maior consoante a temperatura a que a amostra é submetida. A análise estatística realizada por *two-way ANOVA* encontra-se apresentada na **Tabela 16**, de acordo com esta análise é possível afirmar que tanto o efeito da temperatura como da concentração de extrato são significativos, contudo o efeito da temperatura possui um valor de P melhor ($P=0,0002$ para a temperatura e $P=0,0049$ para a concentração de decocção) sendo assim mais significativo, contudo a interação dos dois fatores não são estatisticamente significativos para $P<0,05$.

Tabela 16. Análise estatística dos resultados obtidos para a percentagem de atividade do enzima AChE na presença das diferentes amostras de BSA com a decocção de *P. barbatus*, sendo *- $P < 0,05$, **-* $P < 0,01$ e ***-* $P < 0,001$.

	Sem BSA	25 °C	37 °C	55 °C	70 °C	100 °C
Sem BSA		2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ** 4 mg/mL - *	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns
25 °C			2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ** 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns
37 °C				2 mg/mL - ** 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ** 4 mg/mL - *	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns
55 °C					2 mg/mL - *** 4 mg/mL - *	2 mg/mL - * 4 mg/mL - ns
70 °C						2 mg/mL - ** 4 mg/mL - ns

Relativamente à decocção de *P. barbatus* na concentração de 2 mg/mL (**Figura 47**) verifica-se que existe uma tendência crescente, não muito significativa, consoante o aumento de temperatura, apesar de a temperatura de 55 °C e de 70 °C apresentarem valores discrepantes, no caso da temperatura de 55 °C o valor é muito baixo e no caso da temperatura de 70 °C a percentagem de atividade é exageradamente grande. Na concentração de 4 mg/mL (**Figura 48**) esta tendência crescente também é verificada, contudo as percentagens de atividade das temperaturas 25 °C, 37 °C e 55 °C são aproximadamente as mesmas, já as temperaturas de 70 °C e 100 °C são superiores às últimas referidas. Se se observar cada temperatura individualmente verifica-se que a percentagem de atividade diminui consoante o aumento de concentração de decocção, à semelhança do que acontece com a amostra que contém apenas decocção nas mesmas concentrações.

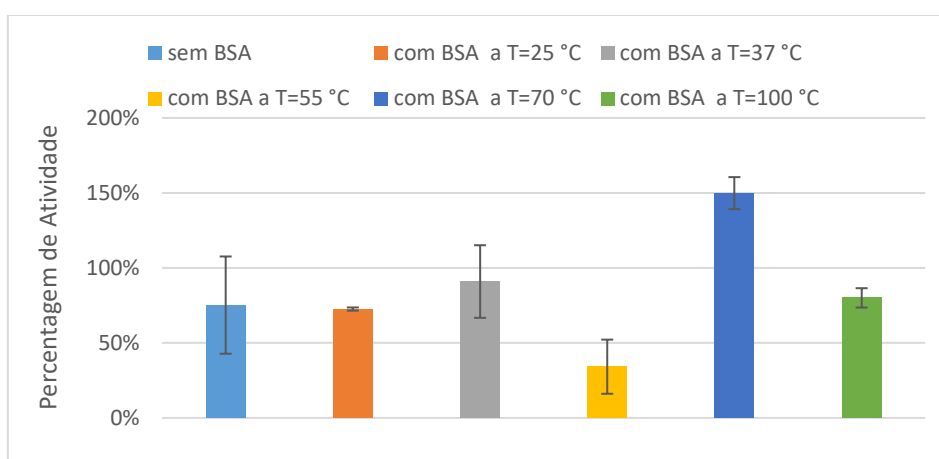


Figura 47. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 2 mg/mL de *P. barbatus* para as diferentes temperaturas.

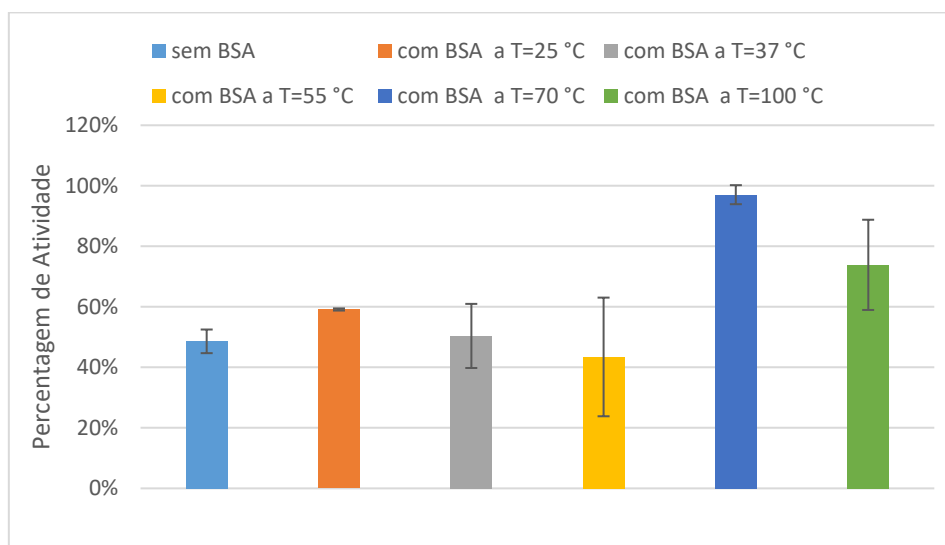


Figura 48. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 4 mg/mL de *P. barbatus* para as diferentes temperaturas.

Relativamente à decocção do *P. zuluensis* é possível observar na **Figura 49** que as amostras que não possuem BSA apresentam uma percentagem de atividade mais baixa do que todas as outras. A amostra de concentração 2 mg/mL (**Figura 50**) apresentam uma percentagem de atividade na ordem dos 100 % independentemente da temperatura a que a amostra foi sujeita. Já na concentração de 4 mg/mL de *P. zuluensis* (**Figura 51**) verifica-se que consoante o aumento da temperatura a percentagem de atividade vai aumentando, exceto para a temperatura de 55 °C. O aumento de percentagem de atividade verificado consoante o aumento de temperatura a que a amostra foi submetida deve-se ao grau de desnaturação do enzima. Com o aumento da temperatura a proteína vai aumentando o grau de desnaturação o que permite a ligação de mais compostos fenólicos, assim sendo faz sentido que a percentagem de atividade aumente uma vez que os compostos fenólicos existentes em solução não conseguem entrar no centro ativo do enzima de modo a causar inibição. A análise estatística realizada por *two-way ANOVA* para as percentagens de atividade do enzima AChE na presença das amostras sem e com BSA de diferentes concentrações de decocção de *P. zuluensis* encontra-se apresentada na **Tabela 17**. De acordo com esta análise é possível afirmar que tanto o efeito da temperatura como da concentração de extrato como da interação dos dois fatores são significativos para um valor de $P < 0,0001$.

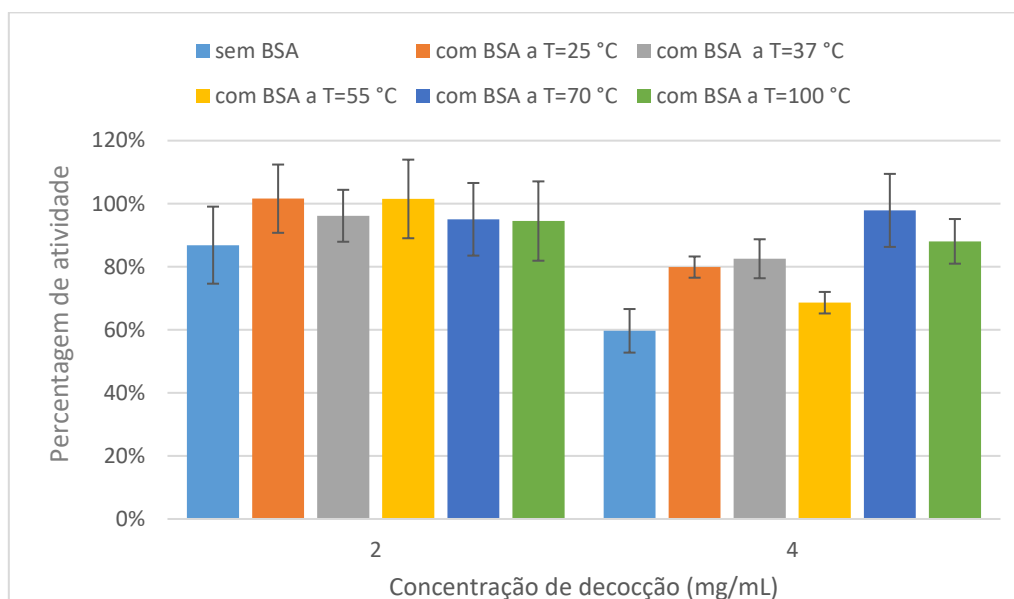


Figura 49. Gráfico de percentagem de atividade do enzima AChE na presença das diferentes amostras de BSA com a decocção de *P. zuluensis* testadas no FT-IR.

A ligação de polifenóis a proteínas tem bastante influência nas atividades biológicas das proteínas.⁵⁹ Mas na bibliografia não existem dados de como a associação polifenóis-proteína interfere na inibição do enzima acetilcolinesterase não sendo assim possível fazer comparações dos resultados obtidos com a bibliografia.

Tabela 17. Análise estatística dos resultados obtidos para a percentagem de atividade do enzima AChE na presença de BSA e diferentes concentrações de *P. zuluensis*, sendo *- P<0,05, **-P<0,01 e ***-P<0,001.

	Sem BSA	25 °C	37 °C	55 °C	70 °C	100 °C
Sem BSA		2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***
25 °C			2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***
37 °C				2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***
55 °C					2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***
70 °C						2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***

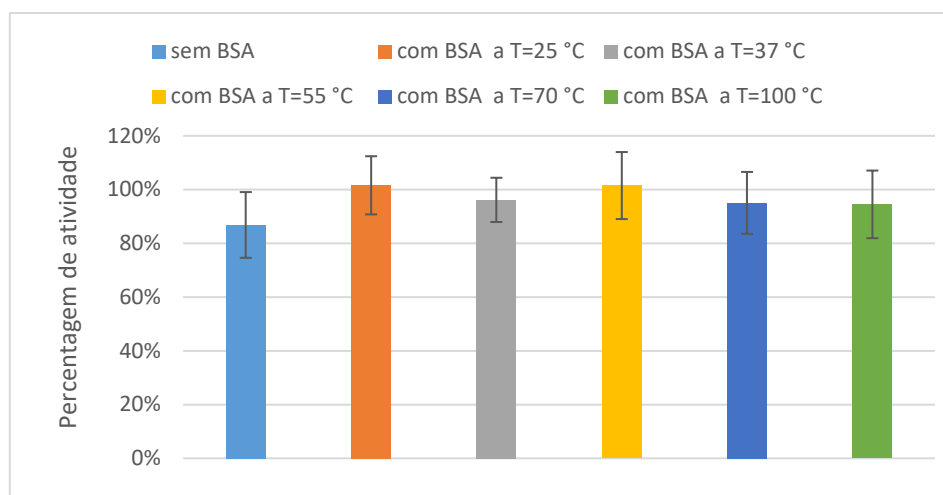


Figura 50. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 2 mg/mL de *P. zuluensis* para as diferentes temperaturas.

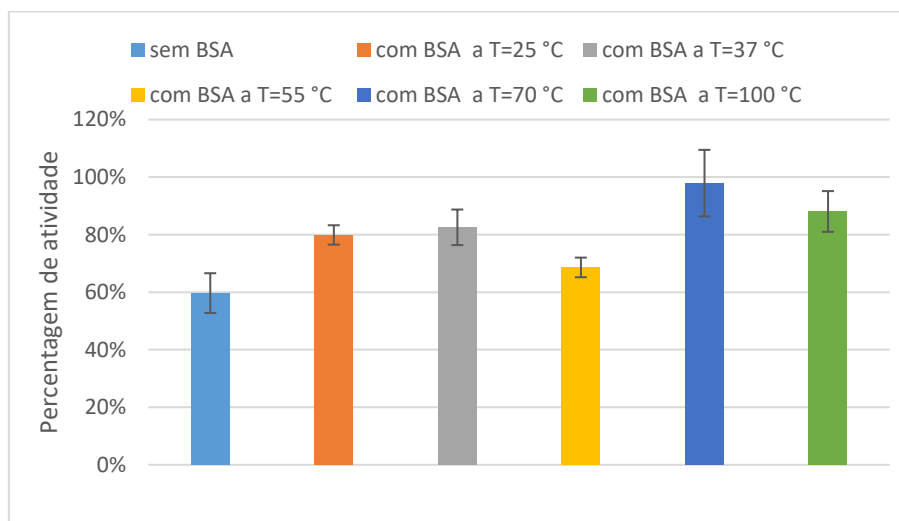


Figura 51. Gráfico da percentagem de atividade do enzima AChE da amostra de BSA com 4 mg/mL de *P. zuluensis* para as diferentes temperaturas.

5.2.1.1.2. Atividade antioxidante

Para além do ensaio cinético da acetilcolinesterase testou-se também a capacidade antioxidante, através do teste do DPPH'. Os resultados encontram-se apresentados na **Figura 52** e na **Figura 53**. As concentrações de 0,4 mg/mL das decocções de *P. barbatus* e *P. zuluensis* com BSA e sem BSA não foram testadas neste ensaio uma vez que se esta concentração é muito inferior ao valor obtido de EC₅₀ das decocções isoladas. Apenas foram testadas as concentrações

de 20 e 40 µg/mL uma vez que eram as concentrações mais próximas do EC₅₀ obtidos para o *P. zuluensis* e *P. barbatus*, respectivamente.

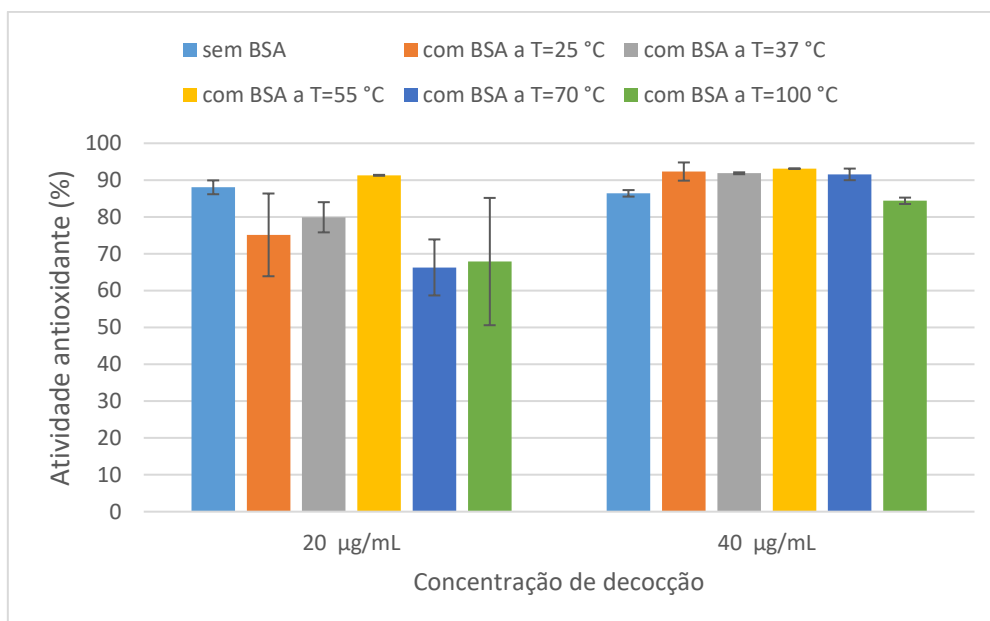


Figura 52. Gráfico de percentagem de atividade antioxidante das diferentes amostras testadas no FT-IR para a decocção do *P. barbatus*.

Na **Figura 52** é possível observar que não existe grande alteração da capacidade antioxidante das amostras que possuem BSA comparativamente com as amostras que não possuem BSA em solução. Apenas na concentração de 20 µg/mL de *P. barbatus* é que se nota uma ligeira diminuição, principalmente nas temperaturas de 70 °C e 100 °C, contudo estas diferenças regra geral não são estatisticamente significativas. A análise estatística de todos os valores obtidos para o *P. barbatus* encontra-se apresentada na **Tabela 18**. De acordo com esta análise é possível afirmar que tanto o efeito da temperatura como da concentração de extrato são significativos, contudo o efeito da concentração possui um valor de P melhor ($P < 0,0474$ para a temperatura e $P = 0,0008$ para a concentração de decocção) sendo assim mais significativo. Assim é possível afirmar que a ligação da proteína aos compostos existentes na decocção de *P. barbatus* não interferem na capacidade antioxidante destes compostos.

Tabela 18. Análise estatística dos resultados obtidos para o valor de EC_{50} para o ensaio do DPPH' das amostras de BSA com a decocção de *P. barbatus*, sendo *- $P < 0,05$, **-* $P < 0,01$ e ***- $P < 0,001$.

	Sem BSA	25 °C	37 °C	55 °C	70 °C	100 °C
Sem BSA		2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - * 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - * 4 mg/mL - ns
25 °C			2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns
37 °C				2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns
55 °C					2 mg/mL - ** 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - * 4 mg/mL - ns
70 °C						2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns

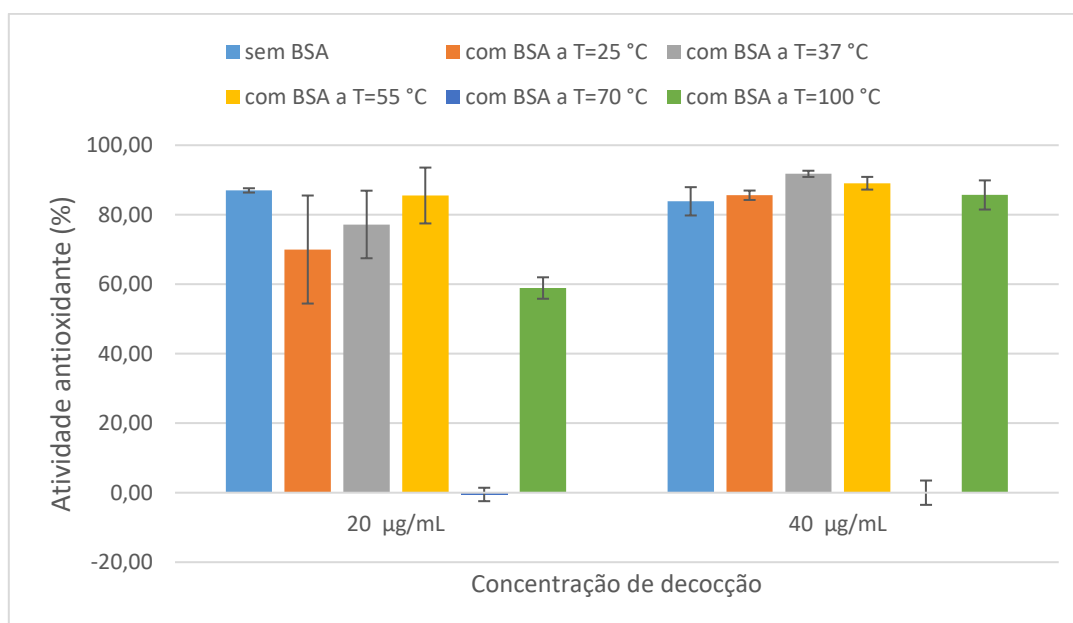


Figura 53. Gráfico de percentagem de atividade antioxidante das diferentes amostras testadas no FT-IR para a decocção do *P. zuluensis*.

Na **Figura 53** é possível observar que na concentração de 20 µg/mL de *P. zuluensis* existe uma diminuição da capacidade antioxidante, principalmente na temperatura de 100 °C. Na concentração de 40 µg/mL não se observa nenhuma alteração quando se compara a atividade da amostra sem BSA com as amostras com BSA a diferentes temperaturas. As amostras de 70 °C não apresentam resultados coerentes, sendo alguns destes são negativos, isto pode dever-se ao facto de a temperatura desnaturar a proteína de forma a esta incorporar os compostos fenólicos existentes na decocção no seu interior, não existindo assim capacidade antioxidante. Assim é

possível afirmar que a ligação da proteína aos compostos existentes na decocção de *P. zuluensis* interferem na capacidade antioxidante destes compostos. A análise estatística para os resultados do ensaio do DPPH' encontram-se apresentados na **Tabela 19**. De acordo com esta análise é possível afirmar que tanto o efeito da temperatura como da concentração de extrato como da interação dos dois fatores são significativos para um valor de $P < 0,005$.

Tabela 19. Análise estatística dos resultados obtidos para o valor de EC_{50} para o ensaio do DPPH' para as amostras de BSA com diferentes concentrações de *P. zuluensis*, sendo *- $P < 0,05$, **-* $P < 0,01$ e ***-* $P < 0,001$.

	Sem BSA	25 °C	37 °C	55 °C	70 °C	100 °C
Sem BSA		2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - ** 4 mg/mL - ns
25 °C			2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns
37 °C				2 mg/mL - ns 4 mg/mL - ns	2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - * 4 mg/mL - ns
55 °C					2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***	2 mg/mL - ** 4 mg/mL - ns
70 °C						2 mg/mL - *** 4 mg/mL - ***

Ao contrário do ensaio de inibição do enzima acetilcolinesterase com soluções de polifenóis-proteína, o estudo das propriedades antioxidantes de polifenóis associados com proteínas encontra-se bastante referenciado na bibliografia. Zorilla *et al.* em 2011 referiu que a capacidade antioxidante da EGCG diminuía quando esta estava associada à β -lactalbumina.⁵⁹ Já Arts *et al.* em 2001 referiu que a capacidade antioxidante do α -tocoferol não era afetada pela ligação deste a proteínas.⁹⁷ Comparando os resultados descritos ao longo da dissertação com os da bibliografia, percebe-se que nem todos os polifenóis agem da mesma forma quando associado a proteínas. As diferenças registadas entre a decocção *P. barbatus* e a decocção de *P. zuluensis* podem dever-se à diferença de composição existente entre as decocções.

5.2.2. Eletroforese nativa

Para testar a hipótese dos agregados realizou-se uma eletroforese nativa segundo o protocolo descrito em “4.2.6. Análise da estrutura de proteínas por eletroforese nativa”, os resultados encontram-se apresentados na **Figura 54** e na **Figura 55**.

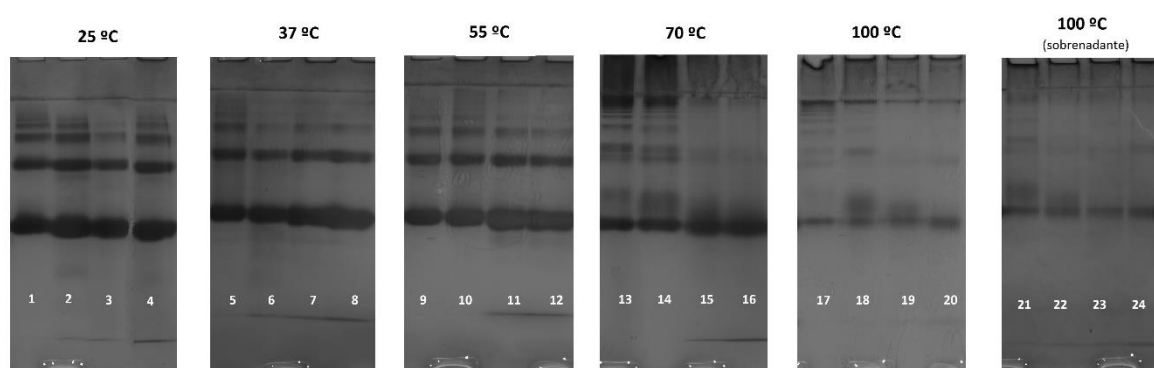


Figura 54. Imagens das eletroforeses nativas das diferentes amostras referentes ao *P. barbatus*, sendo 1, 5, 9, 13, 17 e 21 a BSA às respetivas temperaturas; 2, 6, 10, 14, 18 e 22 a BSA conjuntamente com 0,4 mg/mL de *P. barbatus*; 3, 7, 11, 15, 19 e 23 a BSA conjuntamente com 2 mg/mL de *P. barbatus*; 4, 8, 12, 16, 20 e 24 a BSA conjuntamente com 4 mg/mL de *P. barbatus*.

Na **Figura 54** é possível observar que com o aumento da temperatura as bandas vão diminuindo de intensidade. Nas temperaturas de 25 °C, 37 °C e 55 °C (temperaturas inferiores à temperatura de desnaturação da BSA), a banda referente à BSA mantém-se com a mesma intensidade tanto com a adição da decocção (independentemente da concentração) como sem a adição da decocção de *P. barbatus*. Nas amostras submetidas à temperatura de 70 °C e 100 °C nota-se uma clara diminuição de intensidade das bandas relativamente às outras temperaturas.

Nas amostras que foram submetidas à temperatura de 70 °C nota-se uma ligeira diminuição de intensidade das bandas existentes entre o poço e a banda correspondente à BSA, sendo que quanto maior a concentração de decocção menor a intensidade dessas. Já na banda correspondente à BSA verifica-se um aumento de intensidade da banda consoante o aumento da concentração de *P. barbatus*. Nas *lanes* 15 e 16 ocorre um desaparecimento total das bandas intermédias existentes entre os poços e a banda correspondente à BSA. Observando as *lanes* correspondentes à temperatura de 100 °C, verifica-se um aumento da intensidade da banda de BSA consoante o aumento da concentração de decocção de *P. barbatus*. Nestas existe também o desaparecimento das bandas presentes entre o fundo dos poços e a banda correspondente à BSA. Nas amostras de 70 °C e 100 °C é possível observar uma acumulação de proteínas no fundo dos poços. Esta acumulação deduz-se que sejam precipitados que se formam com a adição da decocção e com o aquecimento das amostras. Estes precipitados devido ao seu tamanho não conseguem incorporar no gel de concentração ficando acumulados no fundo do poço, o que se traduz numa diminuição da intensidade das bandas. Para testar esta hipótese centrifugaram-se

as amostras referentes a 100 °C e aplicou-se o sobrenadante no gel. Observando a eletroforese do sobrenadante das amostras referentes a 100 °C, verifica-se que existe uma ligeira diminuição de proteína acumulada no fundo dos poços e uma diminuição de intensidade de bandas existentes entre o fundo dos poços e da banda correspondente à banda da BSA.

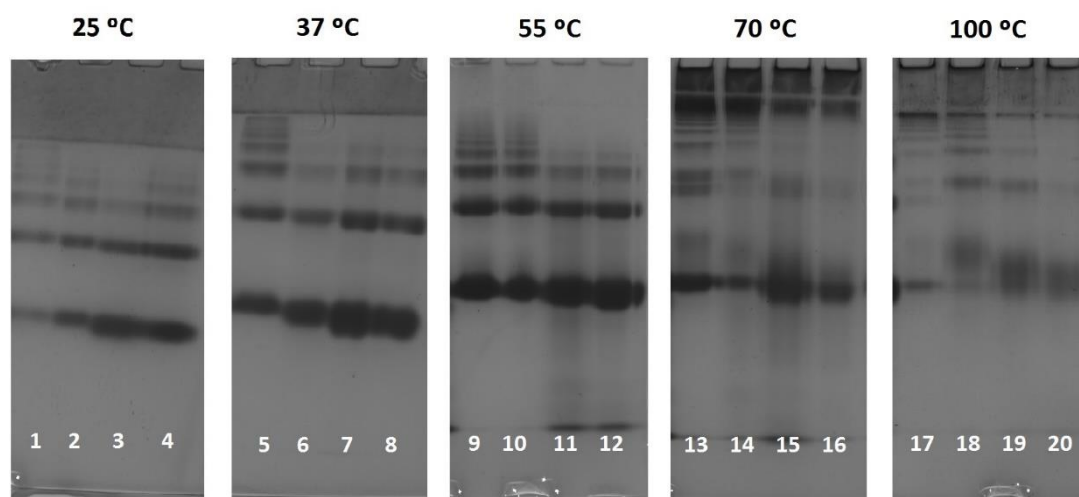


Figura 55. Imagens das eletroforeses nativas das diferentes amostras referentes ao *P. zuluensis*, sendo 1, 5, 9, 13 e 17 a BSA às respectivas temperaturas; 2, 6, 10, 14 e 18 a BSA conjuntamente com 0,4 mg/mL de *P. zuluensis*; 3, 7, 11, 15 e 19 a BSA conjuntamente com 2 mg/mL de *P. zuluensis*; 4, 8, 12, 16 e 20 a BSA conjuntamente com 4 mg/mL de *P. zuluensis*.

No que diz respeito às amostras que possuem BSA e diferentes concentrações da decocção de *P. zuluensis*, é possível observar na **Figura 55** que com o aumento de temperatura, a banda relativa à BSA no estado monomérico diminui de intensidade e, à semelhança do que acontece com a decocção do *P. barbatus*, surgem bandas junto aos poços à temperatura de 70 °C e 100 °C. Já nas temperaturas de 25 °C, 37 °C e 55 °C (temperaturas inferiores à temperatura de desnaturação da BSA), a banda referente à BSA não apresenta uma grande variação de intensidade com a adição da decocção (independentemente da concentração), exceto na eletroforese referente à temperatura de 25 °C que se observa um aumento consoante o aumento de concentração. Nas temperaturas de 70 °C e 100 °C é possível notar uma diferença entre as amostras sem a presença de decocção e as amostras com a presença de *P. zuluensis*, sendo que as amostras que apenas possuem BSA em solução têm uma banda menos intensa do

que as amostras que possuem BSA e decocção. Nestas mesmas temperaturas é possível verificar que a intensidade das bandas relativas às amostras que possuem decocção aumenta consoante o aumento da concentração da decocção. Nas *lanes* 16 e 20 ocorre um desaparecimento de bandas intermédias existentes entre os poços e a banda correspondente à BSA, já nas *lanes* 14, 15 existe apenas uma diminuição de intensidade e nas *lanes* 18 e 19 existe um aumento, contudo estes efeitos não são muito claros. Para as amostras de 100 °C com o *P. zuluensis* não foram testados os sobrenadantes das amostras.

Estes resultados obtidos para as temperaturas de 70 °C e 100 °C são semelhantes aos obtidos por Havea *et al.* em 2000. Neste estudo realizado com BSA e lactalbumina, os autores observaram que existia a formação de agregados proteicos e a diminuição de proteínas no estado nativo com o aumento da temperatura.⁹⁸

5.2.2.1. Quantificação de proteínas

Como é possível observar no capítulo “5.2.2. Eletroforese nativa” existe uma diminuição clara da intensidade das bandas consoante o aumento da temperatura, essencialmente nas temperaturas de 70 °C e 100 °C, apesar de a quantidade de proteína colocada em cada amostra ser igual. De forma a tentar verificar as diferenças entre cada amostra quantificou-se a proteína através de eletroforese nativa como descrito no procedimento explicado em “4.2.6.1. Quantificação de proteínas”, sendo que os resultados são apresentados na **Tabela 20** e na **Tabela 21**. A utilização desta técnica para a quantificação de proteínas em detrimento de métodos colorimétricos e espectrofotométricos deveu-se ao facto de os polifenóis existentes em ambas as decocções causarem interferência com os métodos referidos.

Tabela 20. Tabela com os resultados da quantificação de proteínas para as amostras com a decocção *P. barbatus* e as respetivas retas de calibração, sendo y o valor de absorvência e x a concentração.

Amostra	Quantificação Proteica (mg/mL)	Reta de Calibração utilizada
BSA 25 °C	3,09	$y = 6275,4x + 12561$ $R^2 = 0,4435$
BSA 25 °C + <i>P. barbatus</i> 0,4 mg/mL	4,35	
BSA 25 °C + <i>P. barbatus</i> 2 mg/mL	4,41	
BSA 25 °C + <i>P. barbatus</i> 4 mg/mL	2,36	
BSA 37 °C	3,50	$y = 4517x + 7291$ $R^2 = 0,6185$
BSA 37 °C + <i>P. barbatus</i> 0,4 mg/mL	4,27	
BSA 37 °C + <i>P. barbatus</i> 2 mg/mL	4,82	
BSA 37 °C + <i>P. barbatus</i> 4 mg/mL	4,39	
BSA 55 °C	3,68	$y = 5180,5x + 14647$ $R^2 = 0,8144$
BSA 55 °C + <i>P. barbatus</i> 0,4 mg/mL	3,38	
BSA 55 °C + <i>P. barbatus</i> 2 mg/mL	4,91	
BSA 55 °C + <i>P. barbatus</i> 4 mg/mL	5,07	
BSA 70 °C	0,93	$y = 3653,6x + 18320$ $R^2 = 0,6716$
BSA 70 °C + <i>P. barbatus</i> 0,4 mg/mL	1,44	
BSA 70 °C + <i>P. barbatus</i> 2 mg/mL	0,87	
BSA 70 °C + <i>P. barbatus</i> 4 mg/mL	1,42	
BSA 100 °C	-1,54	$y = 7582,8x + 7565,3$ $R^2 = 0,9373$
BSA 100 °C + <i>P. barbatus</i> 0,4 mg/mL	0,70	
BSA 100 °C + <i>P. barbatus</i> 2 mg/mL	0,07	
BSA 100 °C + <i>P. barbatus</i> 4 mg/mL	-0,56	

Observando a **Tabela 20** verifica-se que amostras de 25 °C, 37 °C e 55 °C apresentam valores semelhantes de quantidade de proteína, sendo estes compreendidos entre 2,36 e 5,07 mg/mL. Já nas amostras de 70 °C e 100 °C os valores obtidos na quantificação são muito inferiores a 4 mg/mL, variando entre -1,54 e 1,44 mg/mL. Estas grandes diferenças podem dever-se ao facto de as amostras de 70 °C e 100 °C formarem um precipitado que consiste na associação das proteínas existentes em solução com polifenóis existentes nas decocções. Estes tornam-se demasiado grandes para entrarem nos poros do gel de concentração ficando acumulados no fundo dos poços do gel. Uma vez que é impossível abranger os poços na quantificação, esta proteína precipitada não entra na quantificação, verificando-se assim as diferenças de quantificação entre as amostras que sofrem desnaturação e as que não sofrem. Nos ensaios de FT-IR estes agregados também não são visíveis uma vez que ao colocar a amostra nas células de

CaF₂, estes agregados podem não ir na amostra recolhida uma vez que não se encontram no sobrenadante. Na **Tabela 20** também é possível observar que o valor de R² da reta traçada para o doseamento das amostras de 25 °C não é muito fidedigno, assim assume-se que o valor obtido para as diferentes amostras a 25 °C é aproximadamente o mesmo (4 mg/mL). Nas restantes amostras é possível verificar a existência de diferenças. Comparando os valores dentro da mesma temperatura das amostras de BSA sem decocção e com as diferentes concentrações da decocção de *P. barbatus* verifica-se que existe sempre um aumento de concentração de proteína consoante o aumento da concentração de *P. barbatus*. Apenas na amostra de BSA com 4 mg/mL de *P. barbatus* a 100 °C este aumento não é verificado, podendo ser devidos a erros de cálculo das áreas das bandas no programa de análise da imagem.

Tabela 21. Tabela com os resultados da quantificação de proteínas para as amostras com a decocção *P. zuluensis* e as respetivas retas de calibração, sendo y o valor de absorvência e x a concentração.

Amostra	Quantificação Proteica (mg/mL)	Reta de Calibração utilizada
BSA 25 °C	3,09	$y = 5133,8x + 8398,3$ $R^2 = 0,6821$
BSA 25 °C + <i>P. zuluensis</i> 0,4 mg/mL	4,24	
BSA 25 °C + <i>P. zuluensis</i> 2 mg/mL	6,58	
BSA 25 °C + <i>P. zuluensis</i> 4 mg/mL	8,02	
BSA 37 °C	3,50	$y = 6371x + 2055,1$ $R^2 = 0,9407$
BSA 37 °C + <i>P. zuluensis</i> 0,4 mg/mL	3,56	
BSA 37 °C + <i>P. zuluensis</i> 2 mg/mL	6,29	
BSA 37 °C + <i>P. zuluensis</i> 4 mg/mL	7,52	
BSA 55 °C	3,68	$y = 4599,7x + 16219$ $R^2 = 0,6337$
BSA 55 °C + <i>P. zuluensis</i> 0,4 mg/mL	3,20	
BSA 55 °C + <i>P. zuluensis</i> 2 mg/mL	4,16	
BSA 55 °C + <i>P. zuluensis</i> 4 mg/mL	3,93	
BSA 70 °C	0,93	$y = 6622,2x + 15819$ $R^2 = 0,9684$
BSA 70 °C + <i>P. zuluensis</i> 0,4 mg/mL	1,28	
BSA 70 °C + <i>P. zuluensis</i> 2 mg/mL	2,73	
BSA 70 °C + <i>P. zuluensis</i> 4 mg/mL	1,48	
BSA 100 °C	-1,54	$y = 7934,5x + 8159,6$ $R^2 = 0,9918$
BSA 100 °C + <i>P. zuluensis</i> 0,4 mg/mL	-0,45	
BSA 100 °C + <i>P. zuluensis</i> 2 mg/mL	-1,50	
BSA 100 °C + <i>P. zuluensis</i> 4 mg/mL	0,16	

Relativamente à **Tabela 21**, observa-se a mesma tendência das amostras com a decocção *P. barbatus*, ou seja, uma quantificação relativamente próxima de 4 mg/mL nas amostras de 25 °C, 37 °C e 55 °C e uma quantificação distante de 4 mg/mL nas amostras de 70 °C e 100 °C. As amostras de 25 °C e 37 °C apresentam uma quantificação ligeiramente superior à que seria esperada, isto pode dever-se a erros de quantificação devido ao facto de nem sempre ser muito fácil a seleção de bandas no *software* ImageJ® ou erros na colocação de amostras no gel influenciando assim a quantidade de proteína por poço. Os valores negativos obtidos na quantificação de proteínas para ambas as decocções podem dever-se ao facto de a quantidade de proteína existente nas respetivas bandas se encontrar em valores inferiores ao limite de deteção do método utilizado. Quando são comparadas as amostras contendo *P. zuluensis* dentro da mesma temperatura a tendência de aumento dos valores obtidos para concentração de proteína também se verifica. Assim é possível afirmar que de certo modo a presença de decocção (*P. barbatus* e *P. zuluensis*) garante uma certa estabilidade da BSA dificultando que a agregação da BSA.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Atualmente o estudo de plantas para fins terapêuticos encontra-se muito em voga, mesmo que as plantas utilizadas no estudo estejam apenas referenciadas como ornamentais. Ao longo do trabalho prático desta dissertação, foram estudadas dez plantas do género *Plectranthus*, tanto a nível de constituição como a nível de atividades biológicas.

O género *Plectranthus* possui como componente maioritário o ácido rosmarínico, sendo que decocção estudada que possuía a maior concentração é a espécie *P. lanuginosus* e a espécie *P. zuluensis*. Estes dois extratos são também os que possuem uma elevada concentração de fenóis e taninos totais. Pelo contrário, o *P. venterii* é o que possui menor concentração de todos os compostos doseados. Para todas as plantas estudadas, com base no seu perfil cromatográfico, não se verificou nenhuma alteração na sua constituição após a simulação da digestão gástrica e pancreática e nenhuma se verificou citotóxica em ambas as linhas celulares testadas.

Relativamente à capacidade antioxidante a espécie que apresenta uma maior capacidade antioxidante é o *P. zuluensis* e a que possui uma menor capacidade antioxidante é o *P. venterii*. Já na atividade inibitória do enzima acetilcolinesterase a decocção que se mostrou mais promissora foi a do extrato *P. zuluensis*. O mesmo não se verificou para a atividade inibitória do enzima álcool desidrogenase, sendo que a decocção que possui maior capacidade de inibir este enzima foi o *P. verticillatus* “Ubombo”. De acordo com estes resultados pode concluir-se que o *P. zuluensis* é o extrato que apresenta melhores qualidades como potencial uso para fins terapêuticos. Um estudo mais aprofundado sobre a sua composição, o(s) composto(s) ativo(s) e sobre potenciais utilizações em fins terapêuticos deveria ser realizado.

Do isolamento de compostos realizado para o extrato da planta *P. zuluensis* conclui-se que o método utilizado para a recolha de frações e secagem do material obtido são extremamente importantes para as atividades biológicas posteriormente testadas, uma vez que influenciam diretamente os valores obtidos. A utilização do evaporador rotativo pode alterar a composição química da fração obtida devido à possível degradação de compostos dependente da temperatura e da superfície de contacto com o ar a que a amostra está sujeita, para além de que as moléculas de eluente não são evaporadas neste método de evaporação. Sendo que o método de recolha que apresentou melhores resultados foi o que usava com eluente metanol e ácido trifluoroacético e o melhor método de evaporação foi o liofilizador e a linha de azoto, contudo são necessários alguns aperfeiçoamentos no método de isolamento de frações.

Relativamente à inibição do enzima acetilcolinesterase, a fração recolhida que mostrou maior atividade foi 1A-L.

A influência das decocções *P. barbatus* e *P. zuluensis* sobre a estrutura de proteínas foi analisada e percebeu-se que ambas as decocções causavam alterações conformacionais na BSA, sendo estas alterações proporcionais à concentração de decocção utilizada. Assim, segundo os resultados obtidos as decocções de *P. barbatus* e *P. zuluensis* possuem um efeito destabilizador da proteína (maiores alterações conformacionais) e não o contrário como seria de esperar devido às propriedades anti-inflamatórias relatadas na bibliografia. Contudo, quando a amostra é sujeita a elevadas temperaturas e quando comparamos as amostras de BSA sem e com a presença das decocções verificamos que o processo de agregação é menor na presença das decocções. Para esclarecer melhor o modo de ligação dos polifenóis à proteína mais alguns estudos de FT-IR e fluorescência poderiam ser desenvolvidos.

Concluindo, dentro da seleção de *Plectranthus* realizada existem plantas com grande potencial medicinal e que deveriam ser melhor estudadas. Para além de que o uso de proteínas em solução pode influenciar as atividades biológicas, nomeadamente a atividade inibitória do enzima acetilcolinesterase. Verifica-se ainda que de facto as propriedades medicinais atribuídas ao *P. barbatus* podem dever-se à sua capacidade de inibição do enzima AchE e ADH e à sua atividade antioxidante. Além das espécies com aplicações etnofarmacológicas verificou-se que uma planta ornamental, o *P. zuluensis*, pode ter aplicações terapêuticas devido à existência no seu extrato de um composto (medioresinol) com atividade inibitória do AchE.

Em trabalhos futuros seria importante um estudo mais aprofundado sobre quais os componentes bioativos nas decocções, e um aperfeiçoamento das técnicas de recolha e evaporação das frações. Para além disso, seria pertinente a realização de estudos de FT-IR (incluindo estudos em água deuterada) e de fluorescência para um melhor entendimento da ligação dos polifenóis existentes nestas decocções às proteínas.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Gurib-Fakim, A. (2006) Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular aspects of Medicine* 27, 1-93.
- [2] Phillipson, J. D. (2001) Phytochemistry and medicinal plants, *Phytochemistry* 56, 237-243.
- [3] Stepp, J. R., and Moerman, D. E. (2001) The importance of weeds in ethnopharmacology, *Journal of Ethnopharmacology* 75, 19-23.
- [4] Petrovska, B. B. (2012) Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacognosy reviews* 6, 1.
- [5] Phillipson, J. D. (2007) Phytochemistry and pharmacognosy, *Phytochemistry* 68, 2960-2972.
- [6] Chan, E., Lim, Y. Y., Chong, K. L., Tan, J. B. L., and Wong, S. K. (2010) Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas, *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 185-189.
- [7] Liu, R. H. (2003) Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals, *The American journal of clinical nutrition* 78, 517S-520S.
- [8] Rice, L. J., Brits, G. J., Potgieter, C. J., and Van Staden, J. (2011) *Plectranthus*: A plant for the future?, *South African Journal of Botany* 77, 947-959.
- [9] Likhoba, C. W., Simmonds, M. S. J., and Paton, A. J. (2006) *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses, *Journal of Ethnopharmacology* 103, 1-24.
- [10] El-hawary, S. S., El-sofany, R. H., Abdel-Monem, A. R., Ashour, R. S., and Sleem, A. A. (2012) Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae), *Pharmacognosy Journal* 4, 45-54.
- [11] Grayer, R. J., Eckert, M. R., Lever, A., Veitch, N. C., Kite, G. C., and Paton, A. J. (2010) Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*, *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 335-341.
- [12] Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, M. A., and Rodríguez, B. (2006) Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria, *Phytomedicine* 13, 267-271.
- [13] Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M. F., Jimeno, M. L., and Rodríguez, B. (2007) Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*, *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 215-221.
- [14] Simões, M. F., Rijo, P., Duarte, A., Barbosa, D., Matias, D., Delgado, J., Cirilo, N., and Rodríguez, B. (2010) Two new diterpenoids from *Plectranthus* species, *Phytochemistry Letters* 3, 221-225.
- [15] Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., and Reis, C. (2014) Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology, *Measurement* 58, 249-255.
- [16] Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M. F., Duarte, A., del Carmen Aprea-Rojas, M., Cano, F. H., and Rodríguez, B. (2002) Neoclerodane and Labdane Diterpenoids from *Plectranthus ornatus*, *Journal of Natural Products* 65, 1387-1390.
- [17] Rijo, P., Simões, M. F., Francisco, A. P., Rojas, R., Gilman, R. H., Vaisberg, A. J., Rodríguez, B., and Moiteiro, C. (2010) Antimycobacterial Metabolites from *Plectranthus*: Royleanone Derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* Strains, *Chemistry & Biodiversity* 7, 922-932.
- [18] Mota, L., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., Barroso, J. G., Miguel, M. G., Faleiro, M. L., and Ascensão, L. (2014) Volatile-Oils Composition, and Bioactivity of the Essential Oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* Grown in Portugal, *Chemistry & Biodiversity* 11, 719-732.
- [19] Caixeta, S. C., Magalhães, L. G., de Melo, N. I., Wakabayashi, K. A. L., de P. Aguiar, G., de P. Aguiar, D., Mantovani, A. L. L., Alves, J. M., Oliveira, P. F., Tavares, D. C., Groppo, M., Rodrigues, V., Cunha, W. R., Veneziani, R. C. S., da Silva Filho, A. A., and Crotti, A. E. M. (2011) Chemical Composition and in vitro Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* Grown in Southeast Brazil, *Chemistry & Biodiversity* 8, 2149-2157.
- [20] Petersen, M., and Simmonds, M. S. J. (2003) Rosmarinic acid, *Phytochemistry* 62, 121-125.
- [21] Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- [22] Papadopoulou, A., and Frazier, R. A. (2004) Characterization of protein-polyphenol interactions, *Trends in Food Science & Technology* 15, 186-190.
- [23] Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., and Williamson, M. P. (1997) Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation, *Biochemistry* 36, 5566-5577.
- [24] Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., and Bravo, J. A. (2014) PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD, *Revista Boliviana de Química* 31, 68-81.
- [25] Falé, P. L., Ferreira, C., Rodrigues, A. M., Cleto, P., Madeira, P. J. A., Florecirc, M. H., Frazatilde, F. N., and Serralheiro, M. L. (2013) Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion, *Journal of Medicinal Plants Research* 7, 1370-1378.

- [26] Dinis, P. C., Falé, P. L., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., and Serralheiro, M. L. (2013) Acetylcholinesterase inhibitory activity after in vitro gastrointestinal digestion of infusions of *Mentha* species, *European Journal of Medicinal Plants* 3, 381.
- [27] Kubínova, R., Pořízková, R., Navrátilová, A., Farsa, O., Hanáková, Z., Bačinská, A., Čížek, A., and Valentová, M. (2014) Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 29, 749-752.
- [28] Quinn, D. M. (1987) Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, *Chemical Reviews* 87, 955-979.
- [29] Soreq, H., and Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase—new roles for an old actor, *Nature Reviews Neuroscience* 2, 294-302.
- [30] Mata, A., Proença, C., Ferreira, A., Serralheiro, M., Nogueira, J., and Araújo, M. (2007) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices, *Food chemistry* 103, 778-786.
- [31] Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P., Silman, I., and Sussman, J. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 9031-9035.
- [32] Barbosa Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. d. F. F., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., da Cunha, E. V., Almeida, J. R., and Quintans-Júnior, L. J. (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 258-285.
- [33] Falé, P. L., Borges, C., Madeira, P. J. A., Ascensão, L., Araújo, M. E. M., Florêncio, M. H., and Serralheiro, M. L. M. (2009) Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"), *Food Chemistry* 114, 798-805.
- [34] Falé, P. L., Amaral, F., Amorim Madeira, P. J., Sousa Silva, M., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., and Serralheiro, M. L. M. (2012) Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines, *Food and Chemical Toxicology* 50, 2656-2662.
- [35] Falé, P. L., Ferreira, C., Maruzzella, F., Helena Florêncio, M., Frazão, F. N., and Serralheiro, M. L. M. (2013) Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves, *Journal of Ethnopharmacology* 150, 718-723.
- [36] Porfírio, S., Falé, P. L., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., Ascensão, L., and Serralheiro, M. L. M. (2010) Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism, *Food Chemistry* 122, 179-187.
- [37] Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., and Thongnoi, W. (2003) Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies, *Journal of Ethnopharmacology* 89, 261-264.
- [38] Lee, K.-M., Kang, H.-S., Yun, C.-H., and Kwak, H.-S. (2012) Potential in vitro Protective Effect of Quercetin, Catechin, Caffeic Acid and Phytic Acid against Ethanol-Induced Oxidative Stress in SK-Hep-1 Cells, *Biomolecules & Therapeutics* 20, 492-498.
- [39] Tsigos, I., Velonia, K., Smonou, I., and Bouriotis, V. (1998) Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from the Antarctic psychrophile *Moraxella* sp. TAE123, *European Journal of Biochemistry* 254, 356-362.
- [40] Dorokhov, Y. L., Shindyapina, A. V., Sheshukova, E. V., and Komarova, T. V. (2015) Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles, *Physiological reviews* 95, 603-644.
- [41] Ganzhorn, A. J., Green, D. W., Hershey, A. D., Gould, R. M., and Plapp, B. V. (1987) Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity, *Journal of Biological Chemistry* 262, 3754-3761.
- [42] Manir, M. M., Kim, J. K., Lee, B.-G., and Moon, S.-S. (2012) Tea catechins and flavonoids from the leaves of *Camellia sinensis* inhibit yeast alcohol dehydrogenase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 2376-2381.
- [43] Haseba, T., Sugimoto, J., Sato, S., Abe, Y., and Ohno, Y. (2008) Phytophenols in whisky lower blood acetaldehyde level by depressing alcohol metabolism through inhibition of alcohol dehydrogenase 1 (class I) in mice, *Metabolism* 57, 1753-1759.
- [44] KLGJ, J. H., and VALLEE, B. L. (1960) The role of zinc in alcohol dehydrogenase, *The Journal of biological chemistry* 235.
- [45] Wagner, F. W., Burger, A. R., and Vallee, B. L. (1983) Kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes, *Biochemistry* 22, 1857-1863.
- [46] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology* 28, 25-30.

-
- [47] Patel, R. D., Mahobia, N. K., Singh, M. P., Singh, A., Sheikh, N. W., Alam, G., and Singh, S. K. (2010) Antioxidant potential of leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) spreng, *Der Pharmacia Lettre* 2, 240-245.
- [48] Magesh, R., Poorani, R., Karthikeyan, V., Sivakumar, K., and Mohanapriya, C. Proportionate Phytochemical Screening and Assessment of Antioxidant Potency on Selected Species of Lamiaceae Family.
- [49] Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003) Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food chemistry* 83, 371-382.
- [50] Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., and Moutounet, M. (1999) Interactions of Grape Seed Tannins with Salivary Proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 42-47.
- [51] Hayakawa, I., Kajihara, J., Morikawa, K., Oda, M., and Fujio, Y. (1992) Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals, *Journal of Food Science* 57, 288-292.
- [52] Kajak-Siemaszko, K., Aubry, L., Peyrin, F., Bax, M.-L., Gatellier, P., Astruc, T., Przybylski, W., Jaworska, D., Gaillard-Martinie, B., and Santé-Lhoutellier, V. (2011) Characterization of protein aggregates following a heating and freezing process, *Food Research International* 44, 3160-3166.
- [53] Baldassarre, M., Bennett, M., and Barth, A. (2016) Simultaneous acquisition of infrared, fluorescence and light scattering spectra of proteins: direct evidence for pre-fibrillar species in amyloid fibril formation, *Analyst* 141, 963-973.
- [54] Murayama, K., and Tomida, M. (2004) Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* 43, 11526-11532.
- [55] Maruyama, T., Katoh, S., Nakajima, M., and Nabetani, H. (2001) Mechanism of bovine serum albumin aggregation during ultrafiltration, *Biotechnology and bioengineering* 75, 233-238.
- [56] Prigent, S. V. E., Gruppen, H., Visser, A. J. W. G., van Koningsveld, G. A., de Jong, G. A. H., and Voragen, A. G. J. (2003) Effects of Non-covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5088-5095.
- [57] Hofmann, T., Glabasnia, A., Schwarz, B., Wisman, K. N., Gangwer, K. A., and Hagerman, A. E. (2006) Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, Castalagin, and Grandinin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9503-9509.
- [58] Ozdal, T., Capanoglu, E., and Altay, F. (2013) A review on protein-phenolic interactions and associated changes, *Food Research International* 51, 954-970.
- [59] Zorilla, R., Liang, L., Remondetto, G., and Subirade, M. (2011) Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication, *Dairy Science & Technology* 91, 629-644.
- [60] von Staszewski, M., Pilosof, A. M. R., and Jagus, R. J. (2011) Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins, *Food Chemistry* 125, 186-192.
- [61] Falé, P. L., Ascensao, L., Serralheiro, M. L., and Haris, P. I. (2011) Interaction between *Plectranthus barbatus* herbal tea components and human serum albumin and lysozyme: Binding and activity studies, *Journal of Spectroscopy* 26, 79-92.
- [62] Dhandapani, R., and Sabna, B. (2008) Phytochemical constituents of some Indian medicinal plants, *Ancient science of life* 27, 1.
- [63] Oktay, M., Gülçin, İ., and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, *LWT - Food Science and Technology* 36, 263-271.
- [64] Liu, J., and Li, S. F. Y. (1995) Separation and Determination of Stevia Sweeteners by Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography* 18, 1703-1719.
- [65] Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., and Walle, U. K. (2004) HIGH ABSORPTION BUT VERY LOW BIOAVAILABILITY OF ORAL RESVERATROL IN HUMANS, *Drug Metabolism and Disposition* 32, 1377-1382.
- [66] Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E., and Gebler, J. C. (2005) Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions, *Journal of Separation Science* 28, 1694-1703.
- [67] Kupiec, T. (2004) Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography, *International journal of pharmaceutical compounding* 8, 223-227.
- [68] Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1767, 1073-1101.
- [69] Pelton, J. T., and McLean, L. R. (2000) Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure, *Analytical biochemistry* 277, 167-176.
- [70] Haris, P. I., and Severcan, F. (1999) FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7, 207-221.
- [71] Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., and Bhattacharya, S. (2012) Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, S178-S180.
- [72] Dunn, M. J. (2014) *Gel electrophoresis of proteins*, Elsevier.

- [73] Muratsubaki, H., Satake, K., Yamamoto, Y., and Enomoto, K. (2002) Detection of serum proteins by native polyacrylamide gel electrophoresis using Blue Sepharose CL-6B-containing stacking gels, *Analytical biochemistry* 307, 337-340.
- [74] Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., and Guilhermino, L. (2005) Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity, *Biomarkers* 10, 360-375.
- [75] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., and Polissiou, M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae), *Food chemistry* 90, 333-340.
- [76] Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., and Borges, F. (2013) Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview, *BioMed research international* 2013.
- [77] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
- [78] Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., and Proksch, P. (2008) Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates, *Nat. Protocols* 3, 1820-1831.
- [79] Wang, H., Provan, G. J., and Helliwell, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry* 87, 307-311.
- [80] Gomes, E. (2014) Phenolic compounds and diterpenoids with activity in aqueous extracts of *Plectranthus*, In *Departamento de Química e Bioquímica*, Universidade de Lisboa.
- [81] Falé, P. L. (2007) Identificação de compostos com actividade antioxidante da acetilcolinesterase em extratos de espécies de *Plectranthus*, In *Departamento de Biologia Vegetal*, Universidade de Lisboa.
- [82] Asimwe, S., Borg-Karlsson, A.-K., Azeem, M., Mugisha, K. M., Namutebi, A., and Gakunga, N. J. (2014) Chemical composition and Toxicological evaluation of the aqueous leaf extracts of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, *Int. J. Pharm. Sci. Invent* 3, 19-27.
- [83] Anthoney, S., and Ngule, C. (2013) Chemical constituents of infused *plectranthus argentatus* leaves, *World Journal of Science*, 2320-1835.
- [84] Bhatt, P., Joseph, G. S., Negi, P. S., and Varadaraj, M. C. (2013) Chemical composition and nutraceutical potential of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) stem extract, *Journal of Chemistry* 2013.
- [85] Ramu, G., Mohan, G. K., Jayaveera, K., Dhanapal, S., and Senthilkumar, G. (2012) Preliminary phytochemical and antioxidant study of hydroalcoholic extracts from selected genera of Indian Lamiaceae, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, S685-S688.
- [86] Kahl, R., and Kappus, H. (1993) [Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E], *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung* 196, 329-338.
- [87] Šebestík, J., Marques, S. M., Falé, P. L., Santos, S., Arduíno, D. M., Cardoso, S. M., Oliveira, C. R., Serralheiro, M. L. M., and Santos, M. A. (2011) Bifunctional phenolic-choline conjugates as anti-oxidants and acetylcholinesterase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 26, 485-497.
- [88] Quintanova, C., Keri, R. S., Marques, S. M., Maria, G., Cardoso, S. M., Serralheiro, M. L., and Santos, M. A. (2015) Design, synthesis and bioevaluation of tacrine hybrids with cinnamate and cinnamylidene acetate derivatives as potential anti-Alzheimer drugs, *MedChemComm* 6, 1969-1977.
- [89] Chen, W.-J. A., McAlhany Jr, R. E., and West, J. R. (1995) 4-Methylpyrazole, an alcohol dehydrogenase inhibitor, exacerbates alcohol-induced microencephaly during the brain growth spurt, *Alcohol* 12, 351-355.
- [90] Drugbank. (2016) <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01213>.
- [91] Delmondes, A., Lima, C. N. F., Pimentel, G., Fernandes, R. B., de Menezes, I. R. A., and Kerntopf, M. R. (2016) Natural resource use in traditional community for the treatment of diarrheal diseases in children from the Northeast of Brazil, *Journal of Medicinal Plants* 4, 30-34.
- [92] Brito, E., Gomes, E., Falé, P. VL, Borges, C., Pacheco, R., Machuqueiro, M., Ascensão, L., Serralheiro, M. L. M. Impact of rosmarinic acid and medioresinol content on the biological activities of infusions of *Plectranthus* species., *Chemistry and Biodiversity* (submitted).
- [93] Oonsivilai, R., Ferruzzi, M., and Ningsanond, S. (2008) Antioxidant activity and cytotoxicity of *Rang Chuet* (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts, *As J Food Ag-Ind* 1, 116-128.
- [94] McManus, J. P., Davis, K. G., Lilley, T. H., and Haslam, E. (1981) The association of proteins with polyphenols, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 309b-311.
- [95] Garidel, P., and Schott, H. (2006) Fourier-transform midinfrared spectroscopy for analysis and screening of liquid protein formulations, *BioProcess International* 48.
- [96] Roy, D., Dutta, S., Maity, S. S., Ghosh, S., Singha Roy, A., Ghosh, K. S., and Dasgupta, S. (2012) Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins, *Journal of Luminescence* 132, 1364-1375.
- [97] Arts, M., Haenen, G., Voss, H.-P., and Bast, A. (2001) Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein, *Food and Chemical Toxicology* 39, 787-791.

- [98] Havea, P., Singh, H., and Creamer, L. K. (2000) Formation of new protein structures in heated mixtures of BSA and α -lactalbumin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1548-1556.